

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Горбунова Анна Владимировна

**РЕОРГАНИЗАЦИЯ ГИППОКАМПА БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ
20-МИНУТНОЙ ОККЛЮЗИИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Виктор Александрович Акулинин

Омск – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	4
ГЛАВА 1 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГИППОКАМПА ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛОЙ КРЫСЫ И РОЛЬ ЭТОГО ОТДЕЛА В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ (СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ).	12
1.1 Особенности структурной организации гиппокампа.	12
1.2 Представления о нейропластичности, как механизмах функционирования, защиты и восстановления нервной ткани головного мозга после повреждения.	18
1.3 Морфологические проявления нейропластичности гиппокампа в постишемическом периоде.	30
1.4 Феномен избирательности проявлений повреждения, нейропластичности и гетерогенности реорганизации межнейронных отношений гиппокампа после ишемии.	33
1.5 Феномен избирательности повреждения и нейропластичности гиппокампа.	38
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	42
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.	55
3.1 Цитоархитектоника гиппокампа в норме и после 20 мин окклюзии общих сонных артерий.	55
3.2 Морфометрическая характеристика изменений цитоархитектоники гиппокампа после 20 мин окклюзии общих сонных артерий.	65
3.3 Иммуногистохимическое исследование структур межнейронной коммуникации нейронов гиппокампа.	70
3.4 Иммуногистохимическое исследование роли плеiotропных белков апоптоза в нейропластической реорганизации межнейронной коммуникации нейронов гиппокампа.	81
3.5 Гистологическая и иммуногистохимическая характеристика	

нейроглиоцитов.	87
3.5.1 Поля СА ₁ и СА ₃	87
3.5.2 Зубчатая извилина и поле СА ₄	98
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.	113
ВЫВОДЫ.	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	130
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Гиппокамп является структурой, играющей ключевую роль в осуществлении важнейших функций головного мозга, а именно когнитивных, памяти, эмоций, ориентации в пространстве у млекопитающих и человека [6]. В связи с этим данный отдел головного мозга интенсивно изучается [203, 222]. Гиппокамп входит в состав гиппокамповой формации, к которой также относят зубчатую извилину, субикулум, пресубикулум, парасубикулум и энторинальную кору [134].

Механизмы ишемического повреждения головного мозга в целом и гиппокампа, в частности, хорошо изучены и представлены в многочисленных современных обзорах [29; 30; 87; 123; 146; 206; 223; 228; 243]. Большое внимание уделяется изучению глиоцитоархитектоники, взаимоотношениям нейронов и глии гиппокампа [77].

Несмотря на то, что основные типы морфологических изменений нейронов, глиальных клеток, синапсов при ишемии и в постишемическом периоде хорошо описаны в литературе, тем не менее, недостаточно освещены вопросы повреждений гиппокампа при острых дисциркуляторных сосудистых расстройствах головного мозга, не сопровождающихся тотальным или очаговым некрозом. Именно такого рода патология головного мозга приводит к появлению различных дегенеративных заболеваний и инвалидизации пациентов после легких травм, неполной ишемии мозга [7; 22; 23; 16; 214].

Несомненно, что более глубокие систематизированные знания структуры всех уровней анатомической и гистологической организации головного мозга, а также особенностей реакции нервной ткани разных его отделов на ишемию необходимы для теоретического обоснования использования различных методов защиты нервных клеток в постишемическом периоде [21; 33; 46; 165; 166; 200; 225; 234]. Особое теоретическое и практическое значение при этом имеет изучение феномена нейропластичности [244].

Нейропластичность – обобщающий термин для описания структурных и

функциональных изменений головного мозга в ответ на различные стимулы в норме и при патологическом воздействии [106; 244]. Она является ключевым компонентом развития и нормального функционирования нервной системы, а также ответом на изменение окружающей среды, старение или патологическое повреждение. Нейропластичность необходима для образования и сохранения функциональных и патологических систем мозга [44; 253]. Превалирование первого или второго пути зависит не только от активности нейронов, но и от нейроглии (астроцитов, олигодендроглиоцитов и микроглиоцитов), которая регулирует процесс формирования и функционирования синаптических связей. При этом aberrantные связи между нейронами и глиальными клетками могут способствовать развитию патологических изменений нейронов [102; 233].

Степень разработанности темы диссертации

Анализ литературных источников указывает на очевидную недостаточность данных для понимания фундаментальных механизмов нейроглиальных взаимоотношений при диффузно-очаговом повреждении гиппокампа после 20 мин окклюзии общих сонных артерий (ООСА). Таких работ мало, слабо изученными являются закономерности пространственной реорганизации цитоархитектоники, а также отростков астроцитов в сравнительном аспекте – в полях CA₁, CA₃, CA₄ и зубчатой извилины. Данное диссертационное исследование вносит вклад в изучение разной степени ишемии головного мозга, ее структурной нейропластичности, служит для уточнения прогноза и выработки дополнительных критериев алгоритма оценки постишемического состояния организма.

Предметом планируемого исследования был поиск новых научных знаний о закономерностях реорганизации цитоархитектоники, межнейронных и нейроглиальных взаимоотношений в гиппокампе и зубчатой извилины головного мозга белых крыс при диффузно-очаговых ишемических повреждениях, вызванных 20-минутной ООСА. Объектом исследования были нейроны, межнейронные синапсы и глиальные клетки.

Цель исследования

Выявление структурно-функциональных изменений нервной ткани гиппокампальной формации белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Задачи исследования

1) Изучить особенности структурно-функциональной организации CA₁, CA₃, CA₄ и зубчатой извилины головного мозга белых крыс в норме.

2) С помощью гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов оценить характер и структурные проявления постишемических деструктивных изменений нейронов, глиальных клеток и межнейронных синапсов CA₁, CA₃, CA₄ и зубчатой извилины.

3) Выявить вероятные механизмы компенсаторно-восстановительной реорганизации нервной ткани и особенности их проявления в разных отделах гиппокампа в постишемическом периоде. Дать характеристику динамики изменения нейроритмо-, глиоцито-, синаптоархитектоники, ядерно-цитоплазматическому и нейроглиальному отношениям.

4) С помощью фрактального анализа исследовать закономерности пространственной реорганизации отростков нейронов и глиальных клеток в полях CA₁, CA₃, CA₄ и зубчатой извилины после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий.

5) Провести сопоставление процессов восстановления межнейронной коммуникации с проявлениями отека-набухания, содержанием темных нейронов, состоянием их цитоскелета, проявлениями реактивного астроглиоза, содержанием нейронов с двумя и более ядрышками в постишемическом периоде.

Научная новизна

Представлены особенности структурно-функциональной реорганизации нейронов, астроцитов, олигодендроглиоцитов и микроглиоцитов, как единой интегративно-пусковой и защитно-восстановительной санирующей системы

гиппокальной формации. Показана перманентная, продолжительная гетероморфная и гетерохронная перестройка нейронов и астроцитов, их белок-синтетического аппарата, межклеточной коммуникации в полях СА₁, СА₃, СА₄ и зубчатой извилине в ответ на неполную острую ишемию головного мозга. Впервые установлено, что функционирование гиппокампа после 20 мин ООСА происходит на фоне необратимого повреждения в поле СА₁ – 31 %, в СА₃ – 20 %, а в СА₄ – 5,3 % пирамидных нейронов. В зубчатой извилине (ЗИ) сохраняется контрольная плотность клеток-зерен. Все это свидетельствует о неравномерном повреждении входа (ЗИ) и выхода (СА₁) гиппокампа. Впервые показано, что компенсаторно-восстановительная реорганизация гиппокампа после ООСА происходит за счет активации реактивного нейроглиоза и нейропластичности сохранившихся нейронов. Нейроглиальный индекс увеличивается в два раза, при этом усложняется пространственная организация отростков астроцитов, особенно мелких периферических. Доля нейронов с двумя и более ядрышками увеличивается в 2,1–3,0 раза. На этом фоне одновременно реализуется пластичность Геббеса и гомеостатическая пластичность (синаптогенез и избирательная элиминация синапсов). Все это в совокупности обеспечивает адаптацию гиппокампа к частичной потере нейронов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты данной работы дополняют информацию о морфологии головного мозга экспериментальных животных в норме и после острой глобальной ишемии. В исследовании получены важные данные для понимания процессов повреждения, компенсации и восстановления, происходящих гиппокампе и зубчатой извилине белых крыс в разные сроки после 20 мин окклюзии общих сонных артерий. Количественные данные позволили оценить особенности нейроглиальных отношений и роли реактивного астроглиоза в структурно-функциональном восстановлении гиппокампальной формации. Полученные результаты будут полезны в экспериментальной гистологии, фармакологии, нейрофизиологии и неврологии, могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах гистологии

при изучении разделов «нервная система, сосудистая система, нервная ткань», физиологии, неврологии медицинских вузов.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой исследования является сравнительное изучение структурно-функциональной организации гиппокампа и зубчатой извилины на макро- и микроскопическом уровнях в норме и после 20 мин окклюзии общих сонных артерий. В работе использован комплекс гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования нервной ткани экспериментальных животных. Это позволило дать характеристику процессов повреждения и компенсаторно-восстановительной реорганизации полей CA₁, CA₃, CA₄ и зубчатой извилины после ишемического воздействия.

Положения, выносимые на защиту

1. После 20-минутной окклюзии общих сонных артерий в гиппокампе увеличивается степень гидратации нервной ткани. На фоне умеренных проявлений отека-набухания изменяются тинкториальные свойства нейронов, разрушаются перикарионы, дендриты и синаптические терминалы, усиливается фагоцитоз. Преобладают диффузные мелкоочаговые изменения, которые имеют гетерохронный и гетероморфный характер.

2. После ишемии в изученных отделах гиппокампа в ответ на деструкцию части нейронов в разной степени реализуются механизмы компенсаторно-восстановительной реорганизации нервной ткани. Ключевыми проявлениями этой реорганизации являются реактивный астроглиоз и перестройка межнейронных связей. Причем реактивный астроглиоз проявляется усложнением реорганизации глиоархитектоники в основном за счет разветвления мелких отростков астроцитов. В разных отделах гиппокампа эти изменения астроцитов отличаются по степени и времени их проявления.

3. В процессе восстановления межнейронных коммуникаций в постишемическом периоде закономерно уменьшаются проявления отека-набухания,

снижается доля темных нейронов, восстанавливается их цитоскелет, усиливаются проявления реактивного астроглиоза, увеличивается содержание нейронов с двумя и более ядрышками, происходит образование избыточного количества синаптических терминалей, активация образования *p38* и *CASP3* в терминалях.

Степень достоверности

Определяется достаточным объемом и корректным формированием изучаемых выборок, высокой информативностью современных методов исследования, адекватностью математических методов обработки данных поставленным задачам. Сформулированные выводы аргументированы и логически вытекают из результатов исследования.

Апробация работы

Основные положения работы доложены и обсуждены на: 5-м Национальном конгрессе с международным участием «Здоровые дети — будущее страны» (Санкт-Петербург, 2021); 15-м Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Ханты-Мансийск, 2020); 8-м Съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019); 20-й Всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2018); Society for Neuroscience 49 Annual meeting (Chicago, USA, 2019); Society for Neuroscience 48 Annual Meeting (San Diego, USA, 2018).

Диссертационная работа апробирована на расширенном межкафедральном заседании кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, кафедры биологии, кафедры анатомии человека, кафедры патологической анатомии, кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии, кафедры общей хирургии, кафедры судебной медицины и кафедры правоведенья ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, 2021).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом

научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России в рамках темы «Реорганизация гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий», номер государственной регистрации АААА-А19-119012190022-4. Работа выполнена при поддержке гранта Фонда Содействия Инновациям по программе «УМНИК». «Разработка программного продукта для морфометрического анализа нервной ткани при диагностике заболеваний головного мозга» 2018–2019 гг. Договор с А. В. Горбуновой № 12392ГУ/2017 от 12.02.2018.

Внедрение результатов исследования

Основные научные данные, теоретические положения, разработанные на их основе, практические рекомендации настоящего исследования внедрены в процесс преподавания на кафедрах гистологии, цитологии и эмбриологии; биологии; патологической анатомии; патологической физиологии; анатомии человека; судебной медицины с курсом правоведения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России при изучении вопросов морфологии и функционирования нервной ткани, органов центральной нервной системы млекопитающих в условиях нормы и при диффузно-очаговых ишемических повреждениях.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 научные работы, в том числе 1 свидетельство о государственной регистрации программы для электронных вычислительных машин, 1 патент на изобретение и 15 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 5 статей в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus).

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 257 источниками, из которых 196 в зарубежных изданиях. Полученные результаты иллюстрированы с помощью 12 таблиц и 37 рисунков.

Личный вклад автора

Эксперимент, забор материала, приготовление препаратов, микрофотографирование, морфометрический анализ изображений и статистическая обработка полученных данных производились автором самостоятельно.

ГЛАВА 1 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГИППОКАМПА БЕЛОЙ КРЫСЫ И РОЛЬ ЭТОГО ОТДЕЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ (СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ)

1.1 Особенности структурной организации гиппокампа в норме и после ишемии

Анатомия и гистология гиппокампальной формации головного мозга грызунов и белой крысы в частности хорошо изучены, имеются подробные обзоры, атласы топографии всех его отделов и сосудистого русла [19; 37; 54; 197; 203, 222]. Разработаны оптимальные стандарты получения гистологических препаратов без артефактов, а также практические подходы нейроанатомической специфической идентификации нервных клеток и их стереометрии [81; 115; 138; 204; 256].

Кроме гиппокампа в гиппокампальную формацию входит зубчатая извилина (ЗИ), субикулум, пресубикулум, парасубикулум и энторинальная кора (ЭК). У млекопитающих гиппокамп располагается в медиальной части височной доли головного мозга, состоит из двух С-образных взаимопроникающих образований – зернистых нейронов ЗИ и пирамидных клеток. Пирамидные клетки сгруппированы в четырех полях: CA₁, CA₂, CA₃ и CA₄. ЗИ охватывает область хилуса, которая содержит полиморфный клеточный слой CA₄ и проксимальную часть пирамидального клеточного слоя CA₃. Поле CA₃ содержит несколько рядов крупных пирамидных нейронов, поле CA₁ состоит из 2-3 рядов небольших пирамидальных клеток, простирается от CA₂ до subiculum. Особенностью гиппокампа является то, что его нейроны расположены очень плотно друг к другу. Связанная с гиппокампом энторинальная кора, как и другие отделы коры головного мозга, состоит из шести слоев – поверхностные слои (I-III) и глубинные слои (IV-VI). Энторинальная кора отличается крупными пирамидными нейронами. В гиппокампе выделяют два основных типов нейронов: пирамидные

нейроны и интернейроны. Афферентный вход в гиппокамп проходит через перфораторный путь из энторинальной коры и заканчивается в молекулярном слое ЗИ. Аксоны нейронов ЗИ формируют мшистые волокна, которые оканчиваются гигантскими терминалями на дендритах и телах пирамидных нейронов CA₃. В свою очередь аксоны пирамидных клеток CA₃ (коллатерали Шаффера) заканчиваются на дендритах пирамидных клеток CA₁, отростки которых проецируются в subiculum и энторинальную кору (круг замыкается). Кроме того, пирамидные нейроны поля CA₁ получают афферентный вход непосредственно от энторинальной коры. Энторинальная кора в свою очередь получает афферентные входы от лимбической коры и неокортекса. CA₃ поле гиппокампа является местом конвергенции потоков информации от ассоциативной коры и филогенетически древних образований ствола мозга. Гиппокамп, таким образом, получает большое количество мультимодальной сенсорной информации из различных отделов головного мозга [134; 222].

Функции гиппокампа многообразны. Он обеспечивает пространственную ориентацию и запоминание определенных мест в пространстве, играет важную роль в обонятельных реакциях (запоминании запахов). Гиппокамп и гиппокампальная формация, включающая субикулум, пресубикулум, парасубикулум и зубчатую извилину, имеет большое значение в обеспечении процессов обучения и памяти [19; 188].

Влияние ишемии на структурно-функциональное состояние неокортекса и гиппокампа хорошо изучено при многих экспериментальных моделях, включая и 4-х сосудистую ООСА [66].

В течение 24ч реперфузии после 10мин транзientной полной ишемии в поле CA₁ крыс Wistar отмечены признаки замедленной гибели нейронов путем апоптоза и некроза. Внутриклеточные изменения соответствовали дегенерации с различной интенсивностью в зависимости от периода реперфузии. Через 3 и 6 ч (начальная стадия) реперфузии наблюдались незначительные и умеренные морфологические изменения (отек органелл и цитоплазмы). Через 12 ч (промежуточная стадия) после реперфузии наблюдалось явное восстановление

структуры, что позволило идентифицировать больше неизмененных клеток. Через 24 ч (конечная стадия) повреждения нейронов были более серьезным, выявлены клетки с разрушенными мембранами митохондрий и клеточным детритом, разрушением нуклеопротеинов (хроматолиз), отеком эндоплазматической сети и активацией лизосом – типичные проявления некроза (клетки-тени). Астроцитарные концевые ножки, окружавшие кровеносные капилляры, были чрезмерно отечными, с многочисленными вакуолями в электронно-прозрачной цитоплазме. В капиллярах появились складки, что привело к интенсивному уменьшению их просветов. Некротизированные нейроны сочетались с апоптотическими телами. Таким образом, в течение 24 ч реперфузии развиваются все основные патоморфологические процессы – дистрофические изменения становятся необратимыми, некробиоз переходит в некроз и функции нейрона прекращаются [66].

Так, в крупном очаге полной ишемии в течение 60 мин появляются признаки гипоксической деполяризации, оксидативного стресса, эксайтотоксичности, активации генов раннего ответа, которые сохраняются до 10–2 ч. Через 1 ч – 4 сут активируются транскрипционные факторы, через 1 ч – 1 сут – белки теплового шока, через 1,5 ч – 4 сут – цитокины. Через 30–60 мин начинаются необратимые повреждения митохондрий, которые сохраняются в течение 1 сут. Структурные признаки стресса эндоплазматической сети выявляются от 2 ч до 3 сут. Воспалительные изменения в очаге повреждения начинаются через 3 ч, сохраняясь до 4–5 сут, реакция астроцитов: 4–5 ч – 6–7 сут, глиоз: 3–4 сут – 10 сут, ангиогенез: 4 сут – 10–14 сут. Таким образом, активная перестройка нервной ткани в очаге повреждения продолжается не менее 14 сут после полной острой ишемии [189; 216; 228].

Некротизированные нейроны под действием гидролитических ферментов подвергаются разложению – аутолизу и утилизируется с помощью неповрежденных нейронов, астроцитов (Ас) и микроглиоцитов (МГЦ). Если очаг некротического повреждения распространяется на несколько нейронов, то развивается воспаление с последующим нейроглиозом [93; 163; 176; 184; 257].

Другие некротически измененные нейроны не лизируются, вероятно, в силу лизосомальной дисфункции. В период некробиоза они теряют воду, их перикарион сморщивается и уплотняется (пикноморфные нейроны), далее происходит распад ядра (кариопикноз, кариорексис), а только потом ядерное вещество растворяется (кариолизис) с участием микроглии [101; 163; 216; 255].

Особенности структурно-функциональной организации гиппокампа (его цито-, дендро-, синапто-, глио-, ангиоархитектоника), вероятно, оказывают влияние на исход ишемического воздействия. Например, сравнительный анализ неокортекса и гиппокампа показал, что в неокортексе количество необратимо измененных нейронов через 24 ч после травмы было в два раза меньше, чем количество темных нейронов в более раннем сроке. С другой стороны, в гиппокампе количество мертвых нейронов было примерно таким же, как и количество темных нейронов. Эти данные свидетельствуют о том, что почти все темные нейроны гиппокампа неизбежно погибали [241].

Проблема темных нейронов до конца не решена [115]. Они могут быть без и с признаками необратимых структурных изменений [64; 151]. В основе образования темных нейронов без структурных изменений ядра и цитоплазмы лежит потеря клеткой воды. Быстрое и массивное выделение жидкости не может быть объяснено каким-либо ферментативным мембранным насосным механизмом или осмотическими градиентами. Напротив, это согласуется с неферментативным (физико-химическим) явлением – фазовым переходом гелиевой белковой сети цитоплазмы с изменением нековалентных взаимодействий. Подобные изменения фазового состояния белков могут быть связаны с фиксацией альдегидами, последующим забором материала, температурным режимом хранения материала и другими физическими факторами, не имеющими отношения к прижизненным ишемическим химическим механизмам. Иницируемый либо химическим, либо физическим триггером в одной внутриклеточной точке фазовый ступенчатый переход гель-гель-золь распространяется по всей клетке по принципу домино и на одном из этапов уплотняет ультраструктурные компоненты геля (длинные молекулы белка), что приводит к тинкториальным изменениям при

гистологической окраске. Подобный переход занимает от 30 до 60 сек и сопровождается выделением относительно большого количества свободной воды (около половины первоначального объема клеток). Последняя сливается в систему лакун, а затем выдавливается через поры и межклеточные каналы в астроциты [114].

Таким образом, образование темных нейронов является обратимым, динамичным и самораспространяющимся ответом на переходные изменения во внеклеточной физико-химической среде любой этиологии. Большинство темных нейронов восстанавливает свою нормальную морфологию и только менее 10 % из них вступает в необратимый дегенеративный процесс. То есть, появление темных нейронов только потенциально предвещает потерю части нейронов неокортекса или гиппокампа. Связь между их возникновением и любым функциональным нарушением или когнитивным дефицитом требует дальнейшего изучения [64].

Для предотвращения возникновения артефактов забора материала требуется перфузионная фиксация, дополнительная фиксация в аналогичном растворе в течение нескольких часов без вскрытия черепной коробки и последующее бережное обращение с тканью, использование стандартных протоколов получения и анализа изображений [81; 115; 256]. Необходимо учитывать высокую вероятность образования артефактных темных нейронов при заборе как контрольного, так и экспериментального материала. А при его анализе исключать из сравнения поля зрения с мономорфными темными нейронами.

Наиболее важной особенностью дегенерации нейронов (если только она не носит острый характер) является неоднородность по внешнему виду, тогда как артефакт темного нейрона всегда мономорфен. Например, нейропилль, прилегающий к дегенерирующим нейронам, может быть мелко вакуолизирован в результате набухания нейрональных отростков или вакуолярные изменения могут наблюдаться в цитоплазме нейронов. Кроме того, дегенерирующие нейроны обычно находятся на разных стадиях дегенерации (например, некоторые из них имеют нормальное ядро, но эозинофильную цитоплазму, тогда как другие имеют пикнотические или фрагментированные ядра) [115]. Особое значение правильная

идентификация действительно патологически измененного нейрона и артефакта «темный нейрон» имеет при проведении морфометрической оценки популяции нейронов. Часто происходит переоценка (гипердиагностика) степени повреждения ткани по количеству гиперхромных нейронов. Тем не менее, с помощью специальных флуоресцентных окрасок (например, Fluoro-Jade C) и иммуногистохимической реакции к phosphorylated extra cellular signal-regulated protein kinase (pERK) установлено, что среди образовавшихся при ишемии темных нейронов значительная часть (50–100 %) является необратимо измененными. Их доля зависит от отдела мозга и модели ишемии или гипоксии. То есть доказано, что ишемия приводит к гибели части нейронов путем образования гиперхромных нейронов [219; 241]. Однако самый главный вывод из этих экспериментов заключается в том, что не все стрессовые нейроны после ишемии погибают и процессом их элиминации можно управлять, например, блокируя комплемент [65; 179].

Известно, что после церебральной ишемии происходит активация комплемента. Он способствует нейронному стрессу, помечая еще живые нейроны для поглощения микроглией, что снижает вероятность благоприятного исхода для стрессовых нейронов после нормализации кровотока. Дистрофически измененные, но все еще живые нейроны в ишемической полутени секретируют молекулярные паттерны, которые связывают C₃ на их мембранах. Опсонизация C₃ приводит к последующему разрушению стрессовых нейронов воспалительной микроглией. Этот ответ объясняет быструю потерю нейронов в ишемически измененной нервной ткани, способствуя хроническому нейродегенеративному воспалению. Локальное использование ингибитора комплемента (названного B4Cry) в эксперименте на мышах приводило к сохранению части поврежденных нейронов [65]. Если B4Cry вводили даже через 24 ч после окклюзии, отмечался эффект, сопоставимый с терапией активаторами тканевого плазминогена (АТП), которые вводили в диапазоне от 3 до 4,5 ч от начала острой ишемии. На сегодняшний день терапия АТП единственный одобренный и эффективный фармакологический путь для терапии инсульта.

Сколько нейронов в гиппокампе можно спасти после разной продолжительности ООСА, а также особенности астроцитарной и микроглиальной реакции неизвестно. Однако четко установлено, что применение разных моделей острой (полной или неполной) окклюзия общих сонных артерий и окклюзия сонной мозговой артерии (ОСМА), ее продолжительность и количество эпизодов влияют на исход восстановления нервной ткани. Полная ишемия вызывает крупноочаговые изменения с вовлечением процесса воспаления, неполная – диффузно-очаговые, без мощной активации провоспалительных цитокинов и микроглии [26; 33; 36; 58; 61; 94; 257].

1.2 Представления о нейропластичности, как механизмах функционирования, защиты и восстановления нервной ткани головного мозга после повреждения

Синаптическая пластичность – это способность уже существующих связей между двумя нейронами изменяться в зависимости от нейронной активности, является основным механизмом обучения и памяти, имеет решающее значение во многих аспектах нормальной и патологической функции мозга [44; 45]. В настоящее время доказана регуляция синаптической пластичности астроцитами [102].

Особое значение уделяется изучению нейропластичности гиппокампа и ее практической значимости при повышении уровня функционирования систем организма, также при стрессе и патологических состояниях [99; 148; 172; 183]. Появляются данные об особенностях функционирования и кодирования информации (роли синаптической пластичности) в нейронных сетях разных полей гиппокампа, например, CA₃ [209]. Современные нейробиологические методы, позволяющие более детально исследовать свойства нейронов, показали явную гетерогенность внутри классических типов клеток, например, пирамидных. Пирамидальные нейроны CA₃, CA₁ и subiculum демонстрируют выраженную пространственную и структурно-функциональную гетерогенность внутри данного

клеточного типа. Становится очевидным, что внутриклеточная гетерогенность является общей и решающей особенностью мозга млекопитающих – она необходима для функционирования, компенсаторной и репаративной реорганизации поврежденного мозга [90].

Роль нейронов. Известно, что нейроны гиппокампа функционируют в широком диапазоне активности, при разном уровне снабжения кислородом и глюкозы, в результате чего их метаболическая и белоксинтетическая активность значительно меняется, порождая соответствующие структурные изменения [181; 250]. После ишемии для одних нейронов в гиппокампе выявлены признаки дистрофии (гидропической, мукоидной, зернистой), атрофии, апоптоза, некроза, фагоцитоза и автофагоцитоза, а для других – гиперплазии и гипертрофии [128; 207; 232; 255]. Эти изменения сопровождаются отёком-набуханием, вакуолизацией, гипохромией (локальным, субтотальным, тотальным разрушением нуклеопротеинов), уплотнением матрикса и гиперхромией ядра и цитоплазмы (без и со сморщиванием, кареорексисом и гомогенизацией клеточных структур) [8; 18; 140; 158; 163; 187; 255]. Наиболее сложно трактовать «темные нейроны», которые могут быть артефактами забора материала [144]. Есть данные, о снижении иммунореактивности специфических белков в подобных нейронах (Cav3), а также в Ac (GFAP) и, в существенно меньшей степени, МГЦ (AIF-1) при иммерсионной фиксации. Авторы объясняют это артефактом, связанным с возникновением полей темных нейронов при заборе материала (физическое сдавливание ткани) [162]. Это свидетельствует о необходимости использовать перфузионную фиксацию при подготовке материала для морфометрического исследования и очень бережно манипулировать с ним при заборе и рассечении (только после дополнительной фиксации). При использовании перфузионной фиксации, патологически индуцированные темные нейроны (либо обратимо, либо необратимо поврежденные нейроны) морфологически неотличимы от индуцированных механическим раздражением темных нейронов. Патологически измененные темные нейроны действительно существуют при экспериментальном исследовании мозга грызунов (после травмы, острой ишемии, реперфузии,

эпилептического статуса, гипокликемии), даже при использовании перфузионной фиксации [162]. То есть, темные нейроны при разных способах фиксации ткани сходны по внешнему виду, но триггерные механизмы у них разные.

Формирование темных нейронов в этих случаях представляет собой раннюю стадию острой реакции нейронов в ответ на потерю АТФ и высвобождение глутамата, сопровождается дегидратацией цитоплазмы. После восстановления кровотока большая часть таких нейронов (до 90 %) восстанавливается до нормохромных, остальные переходят в необратимую стадию повреждения (апоптоз, некробиоз) [64; 141].

Так, через час после реперфузии в сомато-дендритных доменах «темных» нейронов наблюдались гипербазофилия, гипераргирофилия, гиперэлектронная плотность и резкое уплотнение ультраструктурных элементов. Через 1 сут степень ультраструктурного уплотнения уменьшилась и в нескольких «темных» нейронах появились митохондриальные мембранные кристы, свидетельствующие об их восстановлении. Цитоплазма нейронов, проявляющих апоптотическую конденсацию ядерного хроматина, проявляла те же морфологические особенности, что и «темные» нейроны. Через 1 сут невосстанавливающиеся «темные» нейроны, так и апоптотические нейроны, распадались на мембраносвязанные компактные электронно-плотные фрагменты, которые впоследствии поглощались фагоцитарными клетками [64; 151].

Накапливаются данные о роли нейрогенеза в нейропластичности на протяжении всей жизни у многих позвоночных, включая человека. В основном это касается субгранулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа (SGL). Клетки SGL, которые экспрессируют глиальный фибриллярный кислый белок делятся и генерируют новые нейроны в нормальных условиях или после химического удаления активно делящихся клеток у взрослых животных [73; 106]. Однако насколько нейрогенез может быть функционально значим для зрелого головного мозга человека в целом до сих пор не известно. Кроме того, полученные фактические данные интерпретируются неоднозначно. Несмотря на это, в настоящее время нет причин полностью отказываться от идеи, что образование

взрослых нейронов из клеток-предшественников вносит важный функциональный вклад в нейронную пластичность и когнитивные способности на протяжении всей жизни человека. Остается надежда на то, что в процессе изучения нейрогенеза будут открыты новые молекулярные механизмы нейропластичности и их генетическая основа [103; 125; 136; 192; 230; 247].

В аспекте проблемы естественной защиты нервной ткани в постишемическом периоде большое внимание уделяется белкам теплового шока (*HSP*). Синтез *HSP* является универсальным ответом на стресс и играет важную роль в защите клеток от негативных воздействий. Белки теплового шока принимают большое участие в реализации фундаментальных клеточных процессов, а изменение их экспрессии может служить важным диагностическим маркером реакции нейрона на повреждения [29].

В процессе взаимодействия всех типов клеток ЦНС в норме и при патологических состояниях задействованы не только специализированные структурные системы (химические, электрические синапсы), но и более эволюционно старые механизмы пиноцитоза, фагоцитоза и даже слияния клеток по типу синцития [48].

В процессе реорганизации нейронных сетей отмечается увеличение количества клеточных конструкций, в которых перикарионы и тела глиальных клеток значительно сближаются вплоть до инвагинаций более мелких клеток (глиоцитов) в крупные (нейроны) и их слияния. Существует гипотеза о слиянии нейронов и глиальных клеток. Особая роль при этом отводится олигодендроцитам (ОДЦ). Слияние ОДЦ с нейронами, вероятно, может быть частью нормального онтогенеза и возможным средством нейрорегенерации в процессе старения, а также при гипоксическом или ишемическом воздействии. Авторы предполагают, что после такого слияния ядро ОДЦ подвергается нейроспецифическому перепрограммированию, в результате чего образуются двуйдерные нейроны, что удваивает функциональные возможности нейрона [15; 40; 47; 122].

Современные данные свидетельствуют о том, что обстоятельства слияния нейронов весьма специфичны, происходят при определенных стрессовых

условиях. Мало известно о физиологическом эффекте слияния нейронов, но ясно, что оно объективно существует и может иметь последствия как на субклеточном, так и на электрофизиологическом уровнях. Кроме того, выявлены специализированные молекулы, обеспечивающие процесс слияния нервных клеток – фузогены. При этом слитые нейроны длительно сохраняют свою жизнеспособность в составе нейронной сети [113].

Имеются морфологические подтверждения принципиальной возможности слияния нейрональных отростков и перикарионов между собой и другими клетками. То есть, сливаются не только тела клеток, но и их отростки. Этот процесс стимулирует увеличение массы провоспалительных цитокинов. Такая возможность показана для клеток Пуркинью, мотонейронов спинного мозга и пирамидных нейронов неокортекса. Авторы этих публикаций обнаруживали в неокортексе гетеро- и дикарионы – нейроны с двумя ядрами, различающиеся и одинаковые по морфологическим и цитохимическим признакам [88; 116; 152].

В литературе затронута проблема обратимости апоптоза, что свидетельствует о необходимости рассматривать его при ишемии с позиции участия апоптоза в адаптации и репарации нервных клеток (нейропластичности). Недавние исследования показывают, что клетки могут пережить активацию каспазы-3 после кратковременных апоптотических стимулов, этот процесс называется анастазированием (анастаз) [17; 62; 105; 239]. Вполне вероятно, что это возможно и при неполной ишемии. Например, после 20 мин ООСА каспаза-3 выявлялась преимущественно в отростках и синапсах, что подтверждает неапоптотические свойства каспазы-3, которая, вероятно, участвовала в постишемической активации нейропластичности [41].

Гиппокамп в этом аспекте практически не изучен, несмотря на то, что его строение, а именно большая плотность нейронов, предполагает высокую вероятность неспецифических нейрон-нейронных-глиальных взаимоотношений.

Роль нейроглии. Роль нейроглии в иерархии клеточных взаимоотношений нервной ткани постоянно пересматривалась. Долгое время нейроглиальные клетки рассматривались как вспомогательные, обеспечивающие функцию нейронов. В

последние десятилетия получены фактические данные, которые все больше указывают на то, что астроциты, олигодендроциты, шванновские клетки, клетки NG-2 (предшественники олигодендроцитов) и микроглиоциты играют ключевую роль при созревании, нормальном функционировании, в процессе старения и после повреждения нервной системы [30; 93; 117; 141].

Таким образом, по данным современной литературы, процессы происходящие в головном мозге, можно понять только при изучении взаимодействия нейронов и глиальных клеток.

В настоящее время достигнут огромный прогресс в понимании структуры и функции всех типов глиальных клеток. Доказано их участие в определении архитектуры (пространственной организации) центральной нервной системы, регуляции метаболизма мозга, нейротрофическом обеспечении выживания нейронов, в развитии и модуляции синаптической передачи, распространении нервных импульсов и ряде других физиологических функций, включая локальный иммунитет, регуляцию процессов воспаления и апоптоза [77; 94; 100; 117; 198; 257]. При этом показаны пассивная и активная взаимные вспомогательные роли глиии и нейронов (все типы глиальных клеток и нейроны работают в связке) [26; 36; 63]. Например, нейроны обеспечивают трофическую поддержку и регулируют активацию глиии, которая далее обеспечивает оптимальные условия для работы и защиты нейронов [2; 25; 30; 119].

Внутри пула Ас существует структурно-функциональная специализация клеток, два морфотипа. Протоплазматические Ас преобладают в сером веществе, имеют множество сложных тонких и супертонких отростков (кустовидная организация), занимающих четкий домен только одного Ас. Эти отростки контактируют с кровеносными капиллярами, формируя периваскулярные ножки, с нейронами, их дендритами, синапсами в нейропиле и с пиальной поверхностью [63]. В совокупности формируется своеобразная структурно-функциональная единица – сложный глио-нейро-микрососудистый комплекс, на основе которого образуется гематоэнцефалический барьер [129; 153]. Таким образом, Ас в головном мозге лекопитающих разделяют серое вещество на относительно

независимые структурные единицы в пределах своих отростков – домена. Есть данные о том, что домены отдельных Ас могут объединяться в функциональные комплексы через щелевые соединения между их отростками – образование глиального синцития [242]. Концепция ретикулярной (синцитиальной) организации нервной ткани исторически связана с работами А. Догеля. Он распространял ее и на нейроны [48].

Фиброзные астроциты связаны с милиенизированными аксонами (белым веществом) головного мозга, имеют длинные несложные отростки (древовидные). Эти отростки образуют периваскулярные или субпиальные окончания (расширения), контактируют с миелинизированными аксонами, ОДЦ. Фиброзные астроциты (их отростки и расширенные окончания) имеют очень высокую плотность GFAP в цитоскелете, а значит это клетки с повышенной механической прочностью. Они локализуются на границе коры (молекулярный слой), рядом с желудочками и крупными сосудами. Вероятно, их совокупность образует своеобразный каркас по периферии экстринских и ядерных образований головного мозга [3; 63].

В коре головного мозга млекопитающих выявлены видовые и региональные особенности структурной организации Ас. Например, особые формы трансламнарных астроцитов найдены в неокортексе человека. Поэтому изучение феномена структурно-функциональной гетерогенности астроцитов является важным направлением развития нейробиологии, нейроморфологии и нейрофармакологии [3; 50; 131; 141; 249]. Доказано благоприятное влияние астроглиоза на поврежденные нейроны [180]. Показана роль реактивного астроглиального фагоцитоза в процессах саногенеза и ремоделирования нейронных сетей, в очищении поврежденной ткани от микроглии после ишемии мозга [150; 208].

При ишемическом воздействии Ас участвуют в процессах эндогенной репарации и помогают поврежденным нервным клеткам вернуть утраченные функции. Реакция Ас на ишемию зависит от тяжести заболевания и может определять его дальнейшее развитие. Установлено, что глиальный

нейротрофический фактор (GDNF) регулируют процессы нейрогенеза и функционирования нервных клеток в раннем онтогенезе и в сформированном мозге. GDNF вовлечен в формирование синапсов и оказывает влияние на рост, реконструкцию, стабильность дендритов, аксонов и синапсов нейронов неокортекса и гиппокампа [2; 25; 102; 112].

Мертвые нейроны высвобождают эксайтотоксический глутамат, H^+ , K^+ , Ca^{2+} , АТФ, провоспалительные медиаторы, индуцируя вторичное повреждение нервной ткани после острой ишемии. Как правило, реактивные астроциты обеспечивают элиминацию глутамата, антиоксидантную защиту, продуцируют метаболитические субстраты для нейронов, обеспечивают буферизацию K^+ и синтезируют факторы роста для поддержки и восстановления нейронов. Реактивные астроциты также подавляют воспаление путем фагоцитарной активности, регуляции иммунных клеток и формирования физических барьеров вокруг очагов поврежденной ткани. Реактивные астроциты морфологически изменяются, пролиферируют и мигрируют. Их роль в защите нейронов интенсивно изучается. Не до конца понятна гетерогенность реактивных астроцитов внутри вида, между видами и разными отделами головного мозга [180].

Являясь изначально морфологически и функционально гетерогенными клетками, астроциты проявляют повышенную гетерогенность после повреждения нервной ткани. Однако в настоящее время нет ни определения, ни классификации различных типов реактивных астроцитов. Выделяют атипичные A_1 - и типичные A_2 -астроциты. A_1 -реактивные астроциты активируются провоспалительными цитокинами микроглии (IL-1 α , TNF) проявляют сильную нейротоксичность. A_2 -реактивные астроциты активируются ишемией и способствуют выживанию и восстановлению нейронов [156; 186].

Таким образом, типичные астроциты способствуют компенсаторной и репаративной реорганизации нейронных сетей, а атипичные – подавляют эти процессы. Эти Ас отличаются морфологией и площадью отростков, плотностью клеток. Однако режимы активации, биохимические характеристики, определение и характеристика этих типов Ас до сих пор не имеют исчерпывающего

теоретического объяснения. В перспективе будут проводиться исследования двойственной роли и гетерогенности A_1 - и A_2 -реактивных астроцитов в разных отделах мозга при разных моделях повреждения [180].

В настоящее время при изучении нейропластичности большое внимание уделяется микроглиоцитам (МГЦ) [93; 94]. МГЦ составляют 5-10 % клеток головного мозга и являются резидентными иммунными клетками центральной нервной системы. Активация микроглии в настоящее время рассматривается как многостадийный обратимый процесс, который генерирует множество фенотипов реактивных клеток с защитными способностями. Во время воспалительных реакций, травмы, ишемии, активированные микроглии изменяют свой секреторный профиль, увеличивая высвобождение таких факторов, как $C1q$, TNF- α , IL-1 α , и влияют на активацию астроцитов [111; 153].

МГЦ функционируют в тесной связи с астроцитами и олигодендроцитами, которые, в свою очередь, образуют своеобразный глиальный синцитий. Последний образуется за счет щелевых соединений $C \times 43/C \times 43$ с другими астроцитами, щелевых соединений $Cx43/Cx36$ с нейронами, щелевых контактов $C \times 43/C \times 47$ с олигодендроцитами [155].

Подобно Ас, каждый МГЦ имеет свой подконтрольный пространственный домен – территорию нервной ткани диаметром около 50–60 мкм. Отростки неактивированного (покоящегося) МГЦ как щупальцы постоянно сканируют паренхиму головного мозга [126]. Активация МГЦ происходит при повреждении нейрона, выражается в быстрой миграции клеток к месту повреждения. Формируется амебоидный фенотип микроглии, для которого характерны высокая подвижность, преобладание фагоцитарной функции и секреции цитокинов [52; 93]. Потеря связей между нейронами и микроглией после ишемии способствует дальнейшей активации последней, что усиливает нейровоспаление, вызванное высвобождением провоспалительных цитокинов и молекул окислительного стресса. Эти изменения, вероятно, могут быть инициированы перичеселлюлярным отеком, который разрывает связи нейронов и микроглии [30].

Например, показано, что после инсульта нейропластичность проявляется

перестройкой уже имеющихся нейронных сетей и образованием новых нейронов в нейрогенных нишах. При этом перестройки нейронов и их связей имеют сложные взаимодействия с активированной микроглией. Точные механизмы, лежащие в основе этих взаимодействий, остаются плохо изученными. Однако, предполагаются изменения баланса про- и противовоспалительной активации микроглии при формировании новых сетей и синапсов. Несомненно, нейропластичность является следствием избирательной активации механизмов, которые возможны только при взаимодействии микроглия-нейрон-астроцит [93; 185].

Предполагается, что опосредованная микроглией про- или противовоспалительная активность может вносить значительный вклад в спонтанную нейрональную пластичность после ишемии. Провоспалительные цитокины вызывают долгосрочную синаптическую депрессию (LTD). Это указывает на то, что усиленный нейровоспалительный ответ микроглии может быстро изменять активность нейронов и модулировать синаптическую активность или пластичность. При ишемии физический контакт между микроглиальными отростками и межнейронными синапсами увеличивается до 1 ч (в неповрежденном мозге около 5 мин), заканчиваясь исчезновением пресинаптических терминали и элиминацией синаптического устройства [185; 213].

На культурах срезов гиппокампа с помощью трехмерной двухфотонной микроскопии и флуоресценции живых клеток показано, что микроглия находится в тесном контакте с нейронами и играет после ишемии в первую очередь защитную роль, даже через 4 ч после ишемии. Поэтому подавление ее активности с помощью противовоспалительных препаратов в рамках терапевтического окна нежелательно. Нейропротекция связана с целенаправленной доставкой к нейронам нейротрофических факторов роста, таких как BDNF, GDNF, NGF или TGF- β . Важную роль для распознавания переживающих нейронов играет экспрессия CD11a [178].

Таким образом, острая активация микроглии имеет значение для

структурной и функциональной целостности ЦНС. Кроме санации, МГЦ активно участвуют в remodelировании межнейронных связей и восстановлении поврежденной нервной ткани посредством выделения нейротрофических и противовоспалительных факторов [93; 126].

В патологически измененной нервной ткани с участием МГЦ, Ас, ОДЦ и нейронов образуются сложные клеточные системы, которые целесообразно рассматривать в аспекте клеточно-клеточных фагоцитарных и иных типов взаимоотношений с учетом пространственно-временных особенностей основного процесса (повреждение, восстановление). Установлено, что в процессе этих взаимоотношений каждый морфотип глиальных клеток играет особую роль: МГЦ мигрирует и поглощает сому и апикальные дендриты, астроциты фагоцитируют многочисленные мелкие дендритные апоптотические тела, ОДЦ – обеспечивают последующее восстановление аксонов. А все вместе, усиливая синтез нейротрофических факторов, – репаративную реорганизацию нервной ткани в целом [1; 2; 25; 43; 57; 59; 100; 101; 112; 117; 198].

Реакция Ас на ишемическое повреждение хорошо изучена, имеется ряд обзоров на эту тему [25; 198]. Известно, что Ас менее чувствительны к недостатку кислорода и глюкозы, чем нейроны, выдерживает длительное (18–24 ч) воздействие гипоксии тяжелой степени [191]. Это происходит за счет того, что Ас имеют большие запасы гликогена, глутамата и глутамина, которые позволяют им в отсутствии кровотока поддерживать высокий уровень метаболической активности в течение 1–2 ч. Кроме того, в Ас высокая активность пуриваткарбоксилаз, которые позволяют им использовать жирные кислоты и кетоновые тела и обеспечивать глюконеогенез [25].

В ответ на ишемию или гипоксию увеличивается размер Ас. Сначала это происходит вследствие целлюлярного отека (набухания). Первыми на повреждение реагируют отростки Ас, входящие в гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – вокруг капилляров. Значительный приток межклеточной жидкости во внутриклеточное пространство приводит к распространению набухания на всё тело Ас, к нарушению энергетического баланса и ионного гомеостаза,

блокированию работы ионных насосов – обратимым дистрофическим (гидропическим) изменениям и увеличению клеточного объема. Степень целлюлярного отёка Ас зависит от тяжести повреждения. Умеренное набухание сопровождается увеличением синтеза гликогена и в условиях энергетического дефицита может поддерживать жизнеспособность выживших нейронов. Сильное набухание Ас приводит к неблагоприятному эффекту – развитию отёка головного мозга. В самых тяжелых случаях наступает гибель Ас из-за разрыва плазматической мембраны. Отек не сопровождается увеличением синтеза структурных белков Ас (GFAP) [174; 193; 245].

Для обозначения морфологических и функциональных изменений, наблюдаемых в Ас при повреждении ЦНС, был введен термин «реактивный глиоз» или «реактивный астроглиоз». По сути – это защитная реакция астроцитов, направленная на преодоление острого стресса, защиту от ишемического повреждения тканей и восстановление гомеостаза после уменьшения выраженности проявлений отека [198].

Уже в первые часы после ишемии (1–3 ч), выжившие Ас, располагающиеся близко к очагу инфаркта, активно пролиферируют, характеризуются выраженной гипертрофией отростков и синтезом белков промежуточных филаментов (GFAP, виментин). Параллельно увеличивается размер ядер клеток, количество митохондрий и рибосом – происходит усиление метаболической активности клетки. При разрушении целостности ГЭБ Ас создают барьер, который защищает выжившие нейроны от действия клеток воспаления (нейтрофилы, моноциты/макрофаги, т-лимфоциты и др.), свободных радикалов, токсичных факторов. Кроме того, в поврежденной области Ас путем активации клеток эндотелия и фибробластов создают каркас для образования новой сосудистой сети [25; 193; 198; 245].

Таким образом, в настоящее время установлено, что Ас в норме и при ишемии выполняют многообразные функции в нервной ткани. Ас регулируют жизнедеятельность нейронов, обеспечивая их выживание, а также участвуют в эндогенных процессах восстановления нервной ткани.

Становится все более очевидным, что нейроны и глия зависят друг от друга. Так, нейрональные клетки, астроциты, микроглии, NG2-глии и олигодендроциты играют свою роль в ишемической глутаматной эксайтотоксичности. При этом нет однозначного ответа на вопрос о характере этой роли: Ас, МГЦ, NG2 и нейроны имеют как подавляющее, так и стимулирующее влияние на эксайтотоксичность. Кроме того, NG2 теряет способность замещать отмирающие олигодендроциты [141].

Олигодендроциты и аксоны являются основными мишенями ишемического повреждения в белом веществе мозга. Миелинизирующие ОДЦ и их предшественники (NG2) особенно уязвимы к энергетической депривации. Наиболее ранние ишемические изменения видны именно на ОДЦ – особенно набухание их сомы, которое распространяется на миелиновые отростки и приводит к аксональному варикозу. Кроме того, ОДЦ, как и Ас, участвуют в обмене глутамата [79].

1.3 Молекулярные механизмы нейропластичности, ключевые регуляторы ее активности

По данным электрофизиологических исследований головного мозга человека, в течение 1–3 мес. после ишемического инсульта в перифокальной зоне существует уникальная среда повышенной нейропластичности. В этот период происходит максимально возможное спонтанное и опосредованное каким-либо внешним воздействием восстановление структурно-функционального состояния поврежденного мозга. В процессе этого восстановления лежит отбор/стабилизация функциональных связей и разрушение нефункциональных [127].

То есть, нейропластичность предполагает не только образование новых синапсов, но и наоборот, избавление от их излишков. Первая называется пластичностью Хеббеса, а вторая – гомеостатической пластичностью. Первая дает возможность нейронам строить ассоциативные связи (запоминать), а вторая

поддерживать гомеостаз путем разрушения «ненужных» синапсов (синапсов без функции). Часть этих новых связей не нужна и, кроме того, способна навредить, участвуя в образовании патологических нейронных систем мозга [44; 133]. В совокупности эти две разновидности нейропластичности обеспечивают более тонкое структурно-функциональное восстановление межнейронных взаимоотношений после повреждения. Не только повреждение синапсов, но и сам процесс реорганизации межнейронных отношений после гибели части нейронов, приводит к значительным длительным нарушениям баланса возбуждающих и тормозных систем головного мозга [16; 96; 112]. Кроме того, меняется информационная емкость отдельного синапса и единицы объема нейропиля в целом [44; 237].

Поэтому понимание закономерностей реализации феномена нейропластичности невозможно без изучения молекулярных взаимодействий и механизмов функционирования синапсов. В настоящее время идентифицировано множество молекул, участвующих в формировании синапсов, но, при этом, нет общего понимания того, как пре- и постсинаптические нейроны узнают друг друга в мозге и решают установить синаптический контакт. Нет так же понимания того, какие сигнальные пути участвуют в процессе специализации этого синаптического контакта [237; 112].

Известно, что при ишемии усиливается экспрессия структурных и функциональных белков синапсов. Показана более высокая экспрессия Gap43 и более высокие уровни активности каспаз-3 и 7 в нейронах и микроглии, что сопровождалось повышенными уровнями маркеров синаптической пластичности DLG4 и синаптофизина (p38) [246]. Выявлена корреляция и линейная зависимость между структурной реорганизацией дендритных шипиков и синаптической активностью. То есть, для количественной оценки изменений функциональной пластичности можно использовать морфометрические характеристики шипика [112; 133].

Молекулярные механизмы постишемической адаптивной и репаративной нейропластичности частично раскрыты и, в совокупности, включают

1) провоспалительные цитокины, 2) хемокины, 3) сигнальные молекулы, 4) ростовые белки и факторы роста. Нейромедиаторы и BDNF, кроме того, участвуют в сверхэкспрессии глутаматергических рецепторов α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), которые повышают синаптическую эффективность. На молекулярном уровне обучение и хранение памяти связаны с изменениями экспрессии статмина (stathmin), Rb3, рост-ассоциированного белка 43 (GAP-43) и сигнальной системы Nogo. Все эти молекулы, в той или иной степени, участвуют в восстановлении и ремоделировании нейронных сетей головного мозга после ишемии/инсульта. [202].

Наиболее изученными регуляторами нейропластичности являются трофические факторы, например, BDNF. Сверхэкспрессия BDNF в нейронах усиливает прекодиционирующий эффект кратковременных эпизодов гипоксии [1; 80]. Существенную роль при постишемическомнейроваскулярном ремоделировании (рост аксонов, ангиогенез), усиливающим репарацию, играют не только МГЦ, но и моноциты [135; 215]. В этом аспекте становятся все более очевидными постулаты концепции единства и интеграции всех систем организма через модуляцию иммунной системы. На восстановление нервной системы влияет даже микробиом кишечника [202].

В настоящее время установлено, что для регенерации нервной ткани головного мозга млекопитающих после инсульта в острой и хронической фазах необходимо восстановление ангиогенеза, нейро- и глиогенеза. Важнейшими медиаторами ангиогенеза являются BDNF, VEGF, TGF- β , HIF и EPO. VEGF и BDNF также участвуют в нейрогенезе и глиогенезе, начиная от предшественников нейронов и глии в нейрогенных нишах. Клеточная миграция, дифференцировка и (транс)дифференцировка запускаются CXCL12, Nestrin-1 и Neurod-1, в дополнение к VEGF и BDNF. Для завершения процесса регенерации нужны такие факторы, как CK2, GAP-43, LIF, KLF7, CNTF, которые благоприятствуют аксональному росту. Netrin-1, SHH, Sox17, Axin2, АТФ и цАМФ участвуют в миелинизации. Синаптогенез контролируется IGF-1, TNF- α , CXCL12, CCL2,

VEGF, eNOS, BDNF, FGF, CAP, MARCKS, SPRR1. Механизмы контроля аномального роста включают NogoA, Eph A4/A5, CSPG, PTEN, SOC-3. Гематоэнцефалический барьер восстанавливается с участием BDNF (нейротрофический фактор головного мозга); VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста), TGF- β (трансформирующий фактор роста-бета), HIF (индуцируемый гипоксией фактор) EPO (эритропоэтин); ECM (экстрацеллюлярный матрикс), MMPs (металлопротеиназы), CVZ (subventricular zone); CXCL12 (с-Х-с хемокиновые лиганды 12), GAP-43 (связанный с ростом белок 43), LIF (лейкемия-ингибирующий фактор), KLF7 (Kruppel-подобный фактор 7), CNTF (цилиарный нейротрофический фактор), SHH (sonichedgehogsignaling), ATF (аденозинтрифосфат), cAMP (циклический аденозинмонофосфат), IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста-1), TNF- α (фактор некроза опухоли-альфа), CCL2 (C-Cmotifchemokineligand 2); eNOS (эндотелиальная синтаза окиси азота), FGF (фактор роста фибробластов), CAP (кортикальный цитоскелет-ассоциированный белок), MARCKS (миристоилированный богатый аланином субстрат С-киназы), SPRR1 (малый пролин-богатый белок 1), CSPG (протеогликаны хондроитинсульфата), PTEN (гомолог фосфатазы и тензина), SOC-3 (супрессор цитокиновой сигнализации 3) [202; 245].

Таким образом, адаптация, компенсация и восстановление функций головного мозга базируются на феномене нейропластичности и сопровождаются реорганизацией всех его уровней в процессе взаимодействия огромного количества разнообразных классов биологических субстратов и регуляторов. Даже локальные повреждения инициируют реорганизацию структурно-функционального субстрата головного мозга и организма в целом.

1.4 Морфологические проявления деструкции и нейропластичности гиппокампа в постишемическом периоде

Церебральная ишемия приводит к образованию реактивных форм кислорода

(O_2^- ; *OH ; $ONOO^-$), которые оказывают прямое и косвенное влияние на структуры нервной системы. Прямое действие вызывает оксидацию протеинов, нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) и пероксидацию липидов клеточных мембран. Все это в совокупности становится причиной необратимой смерти клеток путем некроза (колликвационный с гипергидратацией и коагуляционный с дегидратацией макромолекул) с участием лизосом. Косвенное влияние заключается в повреждении митохондрий (падение содержания АТФ) и активации транскрипционного фактора NF- κ B. Повреждение митохондрий приводит к высвобождению цитохрома С и активации системы каспаз, которые разрывают цепи ДНК (фрагментация). Эти изменения завершаются программируемой смертью нервных клеток (апоптоз) и фагоцитозом их фрагментов астроцитами и микроглией. Транскрипционный фактор NF- κ B – универсальный фактор транскрипции, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Активация NF- κ B в постишемическом периоде приводит к увеличению экспрессии провоспалительных цитокинов и молекул адгезии с последующим развитием картины локального воспаления, повреждения микрососудов ГЭБ и, как следствие, вторичной ишемии [82; 89; 120; 195; 210; 224].

В многочисленных тематических обзорах и монографиях хорошо описаны структурные изменения разных отделов головного мозга млекопитающих на разнообразных экспериментальных моделях ишемии и гипоксии [97; 121; 137; 160; 177; 251; 255].

По данным литературы, в первые часы неполной церебральной ишемии и период реперфузии, ишемические изменения нейронов проявляются неравномерным вакуолеподобным набуханием митохондрий, набуханием дендритов и аксонных терминалей аксо-дендритных синапсов, разрушением синаптических пузырьков. В некоторых нейронах отмечается набухание цитозоля и кариоплазмы, в других нейронах – наоборот, конденсация и уплотнение цитозоля клетки, а также кариоплазмы ядра. Ишемически измененные нейроны окружаются расширенными астроцитарными отростками или мигрировавшими к

ним и тесно прилежащими астроцитами и олигодендроцитами [51; 175; 240].

Через 1–3 сут после ишемии на фоне типичных нормохромных нейронов выявляется апоптоз, тяжелые ишемические повреждения клеток – кариоцитолитический и коагуляционный некроз. В некробиотически измененных нейронах отмечается набухание ядра и цитоплазмы, значительная вакуолизация и разрушение митохондрий, резкое расширение полостей гранулярной и гладкой эндоплазматической сети, деструкция аксодендритных и аксосоматических синапсов, разрушение ядрышка, ядерного хроматина, рибонуклеопротеидов цитоплазмы, лизис органелл и компонентов цитоскелета, набухание цитоплазмы нейрона. При окраске по Ниссию и гематоксилин-эозином подобные нейроны выглядят как бледная бесструктурная «клетка-тень» с расплывчатыми контурами ядерной и плазматической мембраны [55].

Во всех уплотненных нейронах повышена осмиофилия нуклеопротеидов и дезинтегрированных рибосом, электронная плотность белков цитозоля, аксоплазмы и дендроплазмы, отмечается кариопикноз с глыбчатой конденсацией и маргинацией хроматина, набухание митохондрий, значительная редукция крист, расширение вакуолей комплекса Гольджи и цистерн ГЭС, обнаруживается разрушение аксодендритных и аксосоматических синапсов. Такие нейроны уменьшаются в размерах, вокруг них выявляются умеренно расширенные отростки астроцитов и МГЦ. В исходе? нейрон превращается в гиперхромное остаточное клеточное тело – клетка с пикнотичным ядром и плотной, бесструктурной эозинофильной цитоплазмой, лишенной базофильных глыбок вещества Ниссля (гомогенизация). Гиперхромное уменьшенное остаточное клеточное тело окружено «перинейрональным пространством», представляющим собой расширенные отростки астроцитов и отростки МГЦ. Это типичные проявления коагуляционного ишемического некроза. Часть темных нейронов разрушается путем апоптоза [55; 175; 236].

Вышеописанные изменения характерны и для гиппокампа. Так, после острой 10 мин транзиторной ишемии, вызванной окклюзией 4-х артерий (4-сосудистый метод), в СА₁ гиппокампа крыс выявлены внутриклеточные

дегенеративные изменения различной интенсивности, имеющие признаки апоптоза и коагуляционного некроза [66]. В зоне ишемической полутени умеренная атрофия цитоплазмы, пикноз, кариорексис и кариолизис эозинофильных нейронов развивались через неделю. Эти клетки также были tunnel-позитивными и содержали свободный кальций. Все типы эозинофильных нейронов были негативными для каспаза-3 [248].

Изучена природа постишемической гибели пирамидных нейронов в CA₁ и CA₃ гиппокампа крыс после транзиторной ишемии переднего мозга. Через 1 сут реперфузии в CA₁ гиппокампа выявлялся отек мелких дендритов, через 2 сут отек распространялся на крупные дендриты, митохондрии и эндоплазматический ретикулум. В некоторых нейронах отмечались конденсация (агрегация) ядерного хроматина, деформация ядра без признаков отека. Через 2,5 сут реперфузии в одних нейронах преобладали признаки отека, а в других – скопления конденсированного хроматина. Через 3 и 4 сут после ишемии появлялись глиальные клетки с крупными вакуолями и проявлениями активного фагоцитоза. Через 7 сут активировались процессы пролиферации глиальных клеток и глиоза [254]. При этом большинство нейронов CA₃ после ишемии имели нормальный вид. Через 1 сут реперфузии только у 5–10 % нейронов CA₃ появлялись признаки пикноза ядер и агрегации хроматина. Однако через 3 сут содержание этих нейронов снижалось? и в конце наблюдения темные нейроны с признаками сморщивания полностью исчезали. В CA₃ после ишемии большинство нейронов остались нетронутыми, а небольшая часть, вероятно, подверглась апоптозу [254].

Таким образом, морфологические изменения в гиппокампе проявляются в основном в виде отека, хроматолиза и достигают отчетливой выраженности через 24 ч после реперфузии – острое набухание перикарионов, распыление тигроида и базофилия ядер. Эти признаки являются неблагоприятными и могут рассматриваться как предикторы некроза, развивающегося после окклюзии-реперфузии [33].

Имеются данные о том, что апоптоз играет не главную роль при необратимой деструкции нейронов – клетки с апоптоз-подобной морфологией или

экспрессией caspase-3 составляют менее 10 % ишемически измененных нейронов, в то время как подавляющее большинство – это нейроны, погибающие путем некроза. Смерть CA₁ пирамидных клеток после транзиторной ишемии переднего мозга инициируется через активацию c-Jun Nterminal kinase (JNK) (JNK). Затем следует апоптоза или вторичный (отдаленный) некроз [140].

После транзиторной ишемии мозга показано формирование новых микрососудов в зоне полутени. Процесс модулируется фактором роста эндотелия сосудов и оксидом азота [27; 68; 154; 184]. Имеются работы, в которых показана активация астроцитов и капиллярное ремоделирование после реперфузии в естественных условиях. Численная плотность астроцитов, объем их сомы и диаметр капилляров значительно увеличивались, а расстояние между микрососудами и ближайшими телами астроцитов снижалось [71].

Показана роль межнейронных синапсов в процессе повреждения и восстановления нейронных сетей головного мозга [20; 44; 51; 194; 238]. Установлено, что деструкция синапсов и дендритов происходит в результате обратимой гидропической дистрофии, а реализация нейропластического потенциала в ответ на острую ишемию мозга неизбежно приводит к реорганизации межнейронных отношений и изменениям интегративно-пусковой деятельности головного мозга за счет сохранившихся и образования новых синапсов [44; 51; 112].

Компенсаторные и репаративные морфологические изменения в нервной ткани после ишемии реализуются за счет однотипных механизмов нейропластичности и не имеют каких-то специфических отличий от физиологических реакций (например, адаптивные без повреждений). Различия касаются лишь степени выраженности механизмов нейропластичности и исходов реорганизации межнейронных отношений в ответ на стимулирующий их фактор. Чем больше нейронов погибает или активируются, тем сильнее перестраивается нейронная сеть головного мозга за счет гиперплазии и гипертрофии структур перикарионов, роста дендритов и аксонов, неосинаптогенеза и усложнения синаптических систем (терминали, шипики, дендриты), а также необходимая для

этого реорганизация микрососудистого русла и нейроглии.

1.5 Феномен избирательности повреждения и нейропластичности гиппокампа

Высокая степень гетеромофности разных зон неокортекса и архикортекса давно привлекает внимание исследователей и продолжает изучаться. До конца не понятно, почему в период реперфузии одни нейроны погибают, а другие перестраиваются и восстанавливают функции нейронной сети [69; 225].

Известно, что непродолжительная транзиторная ишемия головного мозга у грызунов вызывает избирательную гибель нейронов в слоях III, V и VI неокортекса, дорсолатеральном стриатуме, поле CA₁ гиппокампа [149; 205]. При этом в CA₁ необратимые изменения пирамидных нейронов становятся видимыми только через несколько суток после ишемии. Это так называемая отсроченная гибель нейронов – нейродегенерация [149; 205].

У монгольских песчанок через 21 сут после 5 мин острой полной ишемии в секторе CA₁ гиппокампа сохранялось только 5,8 % пирамидных нейронов. Выявлялись гипер- и гипохромные нейроны. Через 6 и 10 мес количество выживших нейронов уменьшалось еще больше. Нормальную ультраструктуру имели единичные клетки. Выявлялись только гипохромные нейроны. Расширение аксонов и их демиелинизация отмечались на протяжении 10 мес наблюдения. Отмечалось большое количество фибриллярных астроцитов и даже неповрежденные синапсы, сформированные сохранившимися нейронам. В секторе CA₃ и зубчатой извилине патологические изменения были минимальными [226].

Аналогичные изменения также отмечены у человека после сердечного приступа [132]. Как факторы селективности повреждения изучены эксайтотоксичность, ионный дисбаланс, митохондриальная дисфункция, оксидативный стресс, воспалительные реакции и апоптоз [84; 85; 92; 143; 170; 189; 190; 218; 225; 236]. Однако механизмы этих отсроченных изменений до сих

пор остаются до конца неясными [184; 225].

В незрелом головном мозге в большей степени страдают зоны мозга с высоким содержанием рецепторов глутамата (например, базальные ядра). При этом важную роль играют механизмы эксайтотоксичности и окислительного стресса. Тем не менее, пластичность незрелого мозга выше, чем зрелого [107]. До сих пор спорными являются представления о соотношении некроза и апоптоза, развивающихся в незрелом мозге. Вполне вероятно, что гипоксия/ишемия напрямую вызывает эксайтотоксическую нейродегенерацию, а апоптотическая нейродегенерация наступает, впоследствии, как естественная реакция нейронов на утрату способности формировать нормальные синаптические связи [104; 168].

Среди наиболее уязвимых – пирамидные нейроны CA₁ гиппокампа, которые погибают через 48–72 ч после острой транзиторной ишемии. Нейроны зубчатой извилины и CA₃ относительно устойчивы. Синаптические модификации были особенно тяжелыми и стойкими в области гиппокампа CA₁ по сравнению с зубчатой извилиной [169; 227].

Известно, что ингибирование функций астроцитов и их митохондрий приводит к снижению поглощения глутамата и, как следствие, к усилению степени эксайтотоксического повреждения нейронов. Увеличение выработки активных форм кислорода и митохондриальная дисфункция в астроцитах CA₁ способствует отсроченной смерти пирамидных нейронов. Установлено, что селективная дисфункция астроцитов CA₁ гиппокампа, приводящая к нарушению утилизации глутамата, происходит на несколько дней раньше смерти нейронов. С дисфункцией транспортных систем и митохондрий астроцитов связаны процессы селективного некроза нейронов после транзиторной ишемии. С другой стороны, в ответ на ишемию мозга в астроцитах запускаются механизмы защиты и восстановления нейронов [23; 31; 32; 76; 92].

Электронно-микроскопические исследования показали в нейронах CA₁ наличие отека митохондрий, дезагрегацию полирибосом, деструкции эндоплазматической сети и аппарата Гольджи. Ишемия вызывает перераспределение жидкости, отек клеток гиппокампа, снижение объемной доли

внутриклеточного пространства. Набухание митохондрий является одним из начальных признаков ишемии. Уже через 90 мин реперфузии в гиппокампе крыс показано снижение синтеза белка, через несколько часов этот процесс становится необратимым. Параллельно активируются протеиназы, кальпаины, фодрин, спектрин, каспаза-3. Последняя связана главным образом с дегенерирующими пирамидными нейронами, имеющими признаки фрагментации ДНК, а значит с апоптозом [82; 89; 120; 224].

Через 4 сут после кратковременной полной ишемии погибает 96 % нейронов CA₁ гиппокампа. Таким образом, транзиторная ишемия головного мозга избирательно повреждает пирамидные нейроны CA₁, но не нейроны в зоне CA₃ и зубчатой извилине. Гибель нейронов в CA₁ становится очевидной уже через 1 сут после короткого ишемического эпизода. В основе гибели нейронов во всех случаях лежат механизмы некроза, апоптоза, аутофагии и смешанных форм смерти клеток. Превалируют некротические изменения. В субгранулярной зоне зубчатой извилины через 8 сут после умеренной ишемии увеличивается образование стволовых или прогениторных клеток [78; 147; 235].

Чем активнее выделение глутамата, тем выше вероятность активации кальций-зависимых механизмов деструкции постсинаптических нейронов [227; 235]. В стриатуме одной из причин селективной гибели нейронов считается долговременная постишемическая потенциация синаптической активности и апоптоз [69; 86].

По литературным данным, в гиппокампе различия реакции на ишемию в CA₁ и CA₃ могут быть обусловлены тем, что в CA₃ более многочисленны триады нейрон-астроцит-микроглия, чем в CA₁. То есть, обусловлена разной комплексной активностью нейроглиальных клеточных популяций [153].

Таким образом, феномен селективной гибели нейронов при реперфузии неопровержимо свидетельствует о наличии существенных различий между нейронами головного мозга. Есть чувствительные, есть резистентные. Причины этого продолжают изучаться. Все это становится особенно актуальным после остановки кровотока при реанимации и реабилитации головного мозга [220].

В последнее время в этом контексте большое внимание уделяют изучению феноменов пре- и посткондиционирования. Суть этих феноменов заключается, в том, что реакция нервной ткани на острую ишемию зависит от уровня активации естественных механизмов ее защиты на момент ишемии [12; 23; 24; 31; 32; 58; 60; 61; 80; 85; 110; 257].

Кроме того, результаты изучения головного мозга в этом направлении показали, что нервная ткань обладает выраженной пластичностью, которая обеспечивает неполное восстановление функций поврежденного мозга. Восстановление происходит не за счет регенерации ткани, а за счет ее пространственной реорганизации.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, одобрена Локальным этическим комитетом университета (протокол № 112 от 26.09.2019). В качестве экспериментальных животных использовали белых крыс линии Wistar массой 180–200 гр. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями Международного комитета по работе с лабораторными животными, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей».

Экспериментальная модель. Острую 20 мин ишемию мозга моделировали путем окклюзии общих сонных артерий (ООСА, 2-сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии). Эксперимент проведен на самцах белых крыс линии Wistar (n = 54). Забор материала проводили через 6 ч (n = 6), 1 (n = 6), 3 (n = 6), 7 (n = 6), 14 (n = 6), 21 (n = 6) и 30 (n = 6) сут. Контролем служили ложнопериоперированные крысы (n = 9). Летальность в эксперименте составила 4,86 %.

Состояние животных в послеоперационном периоде оценивалось в баллах с учетом принципов исследования физиологии и патофизиологии головного мозга [10; 28; 39]. Выбор этой модели был обусловлен тем, что, в отличие от фокальной полной ишемии (например, окклюзия средней мозговой артерии), данная модель не приводила к крупноочаговым некротическим изменениям нервной ткани [26; 36].

На фоне премедикации (сульфат атропина 0,1 мг/кг, подкожно) и общей анестезии (Zoletil 100, 10 мг/кг) животным делали воротникообразный разрез кожи на шее, выделяли, препарировали и поднимали на лигатуры обе общие сонные артерии (без сопутствующих пучков нервных волокон), затем артерии пережимались на 20 мин микрохирургическими зажимами. После снятия зажимов рана ушивалась и обрабатывалась антисептиком. Контрольным животным ООСА не выполнялась.

Через 30 мин после ООСА показатель общего состояния составил 39,0 (35,5–44,5) баллов, появлялся рефлекс перевешивания, обычную позу животные не удерживали, отмечались выраженная атаксия, повышенный тонус мышц конечностей, регистрировались клонические судороги мышц конечностей, животные не реагировали на раздражители. Через 1 сут показатель общего состояния составил 15,5 (14,0–20,5) баллов (критерий Манна – Уитни, $p = 0,001$), восстанавливался ритм дыхания, нормализовался тонус мышц конечностей, животные приобретали устойчивость в обычной позе, активно передвигались по клетке, на раздражители отвечали адекватно, принимали воду и пищу. У трех животных двигательная активность снижалась, их состояние оценивалось в 28,2 балла. У пяти животных наблюдалось психомоторное возбуждение вплоть до тонико-клонических судорог, агрессивность, их состояние оценивалось в 44,5 (31,0–48,56) балла. Летальность в эксперименте составила 4,86 %.

Через 3–7 сут после ООСА показатель общего состояния достигал 8,0 (7,2–10,5) баллов, отмечались признаки нарушения эмоционального статуса и психомоторное возбуждение в ответ на раздражитель. Через 14–30 сут после ООСА сохранялись признаки эмоциональной лабильности. Таким образом, у животных после 20 мин ООСА отсутствовали признаки выпадения функций, а неврологические расстройства соответствовали легкой и средней степени тяжести.

Морфологическое исследование. Окраска на жизнеспособную ткань с помощью 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) [58; 160] показала, что после 20-мин ООСА в гиппокампе очаги некроза не формировались, изменения имели диффузно-мелкоочаговый характер. Видимое снижение яркости окраски ткани было отмечено только через 6 ч после ООСА.

После ООСА проводили процедуру рандомизации животных с помощью случайного отбора (генератор чисел) для каждого срока. Это позволило избежать субъективного фактора включения экспериментальных животных в подгруппы. Сосудистое русло мозга промывали введением 100–125 мл раствора 0,9 % NaCl и Фрагмина (5 000 единиц) в левый желудочек сердца и фиксировали перфузией

30 мл 4 % раствора параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) через аорту под давлением 90–100 мм рт. ст. в течение 15 мин. Материал хранился в холодильнике при температуре +4 °С. Подобный подход широко используется при заборе материала [81; 241].

Таким образом, при работе с биологическим материалом соблюдали следующие требования: 1) адекватный наркоз, 2) быстрый доступ для транскардиальной перфузии, 3) перфузия сначала физиологического раствора, 4) последующая перфузия 4 % буферированного параформальдегида, 5) бережное вскрытие и мягкое извлечение фиксированного головного мозга, 6) дофиксация в течение 12 ч в аналогичном растворе. Это значительно уменьшало вероятность появления артефактных темных нейронов [81].

Головной мозг целиком с помощью автомата для гистологической проводки карусельного типа «STP 120» заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы толщиной 2–4 μ на уровнях 2,2 – (–) 4,8 от Брежмы (гиппокамп) [197]. Использовали санный микротом НМ 450 (Thermo) с электронным контролем толщины среза, автоматической подачей образца и системой ретракции. Для окраски гематоксилин-эозином и по Нисслю препараты готовили из каждого 10-го серийного среза (5 – на случай, 25 – на срок). Для иммуногистохимических реакций использовали по 5 срезов на срок. С каждого среза фотографировали 10–15 полей зрения гиппокампа CA₁, CA₃, CA₄ и зубчатой извилины головного мозга белых крыс. При морфометрическом анализе брали 200 (на срок) случайно выбранных полей зрения.

Для формирования вариационных рядов использовали случайным образом отобранные цветные изображения соответствующего сектора гиппокампа: 8–10 областей интересов (ROI) с каждого среза. Формирование окончательных выборок (рандомизация) полей зрения для каждого срока ($n = 25$, на срок) проводили из полученных массивов данных с помощью генератора случайных чисел в программе Statistica 8.0. Таким образом, для морфометрического анализа на срок отбирали по 25 случайно выбранных полей зрения (область интереса) гиппокампа. Такой подход позволил максимально полно отразить разброс

изученных количественных переменных.

Общую численную плотность пирамидных нейронов, астроцитов и олигодендроцитов определяли при окраске по Ниссию и гематоксилин-эозином. При этом идентификацию нейронов проводили по наличию ядрышек на срезах перикарионов (пересчет на 1 мм^2). Ядрышко являлось чрезвычайно устойчивой структурой нейрона, а его размеры и форма не изменялись даже в клетках с явными ультраструктурными признаками ишемического повреждения ядра и цитоплазмы [53].

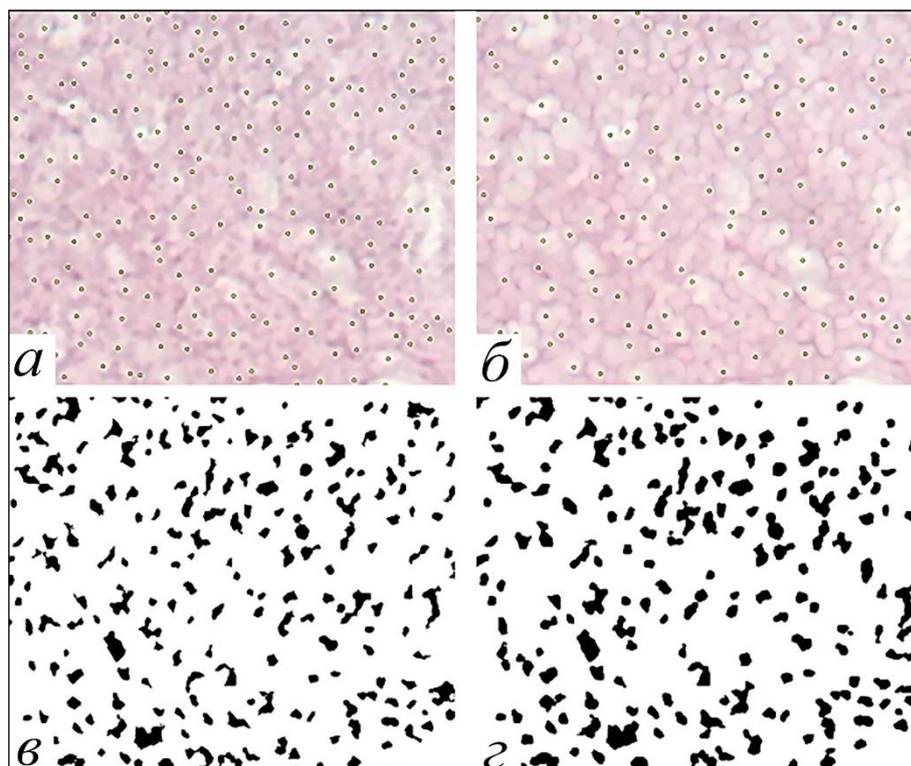
В ходе морфометрического исследования определяли содержание (%) нормо- и гиперхромных нейронов (тёмных несморщенных и пикноморфных). Для морфометрического анализа также использовали иммуногистохимическую реакцию на *AIF-1* (численная плотность микроглиоцитов), *GFAP* (численная плотность астроцитов) и *p38* (численная плотность и площадь синаптических терминалей). Все остальные реакции (*NSE*, *HSP-70*, *MAP-2*, *CASP3*) применяли для идентификации соответствующих структур по специфическим белкам.

Обзорное гистологическое исследование проводили на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином при разрешении объективов $\times 10$ и $\times 40$.

С помощью светового микроскопа Leica DM 1 000 делались цифровые микрофотографии (tif, 2048×1536 пикселей) на увеличении $\times 4$, $\times 10$, $\times 40$ и $\times 100$. Для выявления зон отека-набухания (максимальная яркость пикселей – *Maxima*) нервной ткани использовали плагин-фильтр «*Find Maxima*» *M. Schmid* из программы ImageJ 1.53c (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>).

Предварительно ROI (зона интереса, только нейропилль) подвергалась обработке алгоритмом плагина «*Morphological Filters*» из пакета «*MorphoLibJ*» (Radius 1 pix). Это позволяло провести морфологическую сегментацию объекта изучения и в какой-то степени стандартизовать изображения. В результате после использования плагина на изображение нейропиля выявлена большая относительная площадь зоны максимальной яркости (ЗМЯ), но меньше их количество: 12,5 и 15,4 %, количество – 202 и 174 соответственно (Рисунки 1 *a-z* и 2 *a-z*). При изучении проявлений отека-набухания подобный элемент

стандартизации использован для всех изображений.



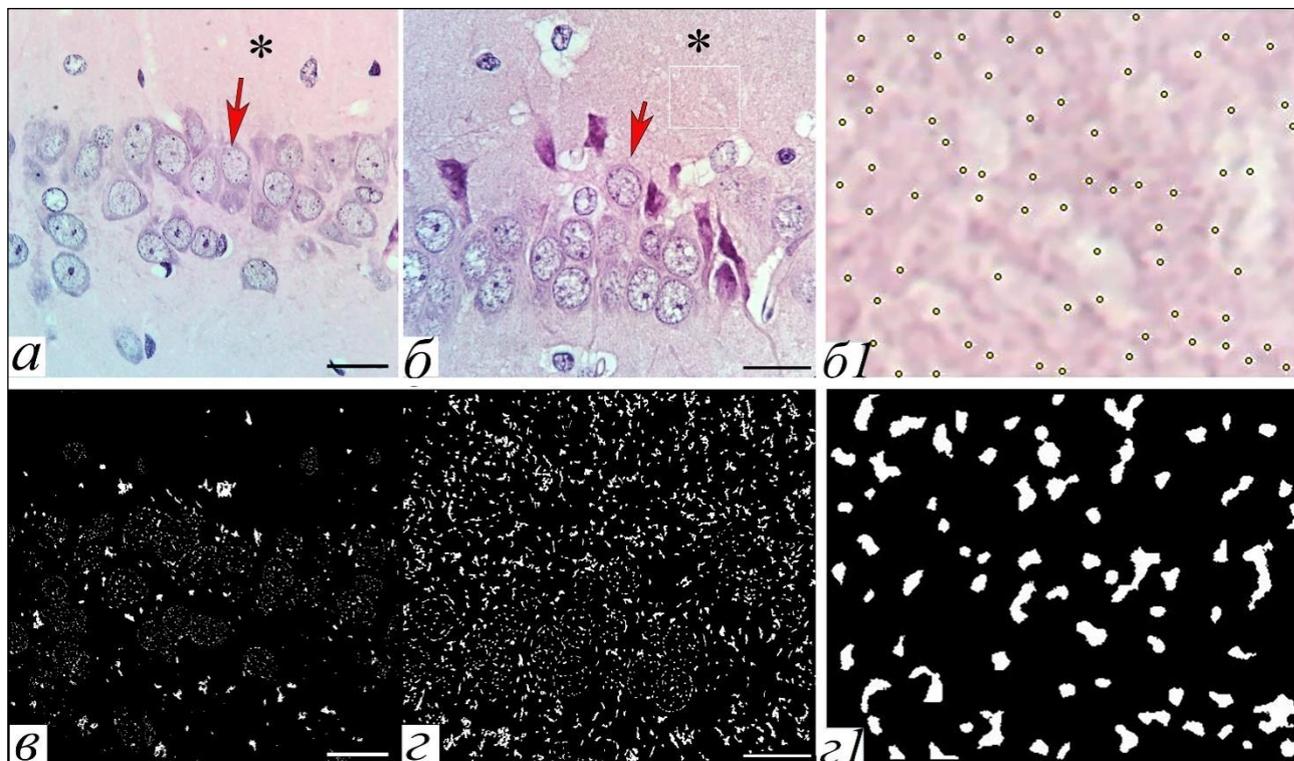
Примечание. На одной и той же области интереса разное количество ЗМЯ и разная площадь. Окраска гематоксилин-эозином, объектив $\times 100$.

Рисунок 1 – Область интереса СА₁ гиппокампа (*a* – оригинальное изображение; *б* – применение плагина; *в*, *г* – соответствующие маски, 1 сут после 20 мин ООСА)

На полученных масках изображений определяли («*AnalyzeParticles*») относительную площадь (S , %), численную плотность (N , на $2\,500\text{ мкм}^2$) и площадь одной (S_{maxima} , мкм^2) зоны максимальной яркости (Рисунок 2). Неравномерность распределения ЗМЯ оценивали с помощью алгоритма водораздела «*Segmented Particles*», примененного к значениям яркости изображения, использовали режим «*Maxima Within Tolerance*», а для отсеечения пустых крупных сосудов подбирали значение «*Prominence*» [34; 35].

Таким образом, с помощью объединения плагинов «*Find Maxima*» и «*Morphological Filters*» можно оценивать численную плотность и относительную площадь/объем, занимаемую зонами максимальной яркости (отек-набухание) в

гиппокампе после 20 мин ООСА. Это возможно за счет объединения подсчета количества точек максимальной яркости и подбора порога фактической области, которые находятся выше и ниже порога.



Примечание. Стрелки – слой пирамидный нейронов, * – молекулярный слой. Окраска гематоксилин-эозином, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм.

Рисунок 2 – CA₁ гиппокампа (а, в – контроль; б, г – 1 сут после 20 мин ООСА): технология морфометрического измерения зон максимальной яркости изображения: а, б – стандартная случайно выделенная область интересов; в, г – результат применения фильтра «Find Maxima» и плагина «Analyze Particles».

Зоны максимальной яркости (б1, г1) имеют сложную форму.

После 20 мин ООСА количество зон визуально больше, чем в норме.

На выделенной области интереса выявлено 71 зона максимальной яркости (б1), которые занимают 11,1 % ее площади (г1)

Иммуногистохимическое типирование. Идентификацию клеток (пирамидные нейроны/глия) гиппокампа проводили на светооптических препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином и по Нисслю, а также при

иммуногистохимическом типировании *NSE*, *MAP-2* (нейроны), *GFAP* (астроциты) и *AIF-1* (микроглия). Численную плотность перикарионов пирамидных нейронов, астроцитов и олигодендроцитов определяли при окраске по Нисслию, а микроглиоцитов – с помощью типирования *AIF-1*. Состояние цитоскелета нейронов (тела и дендриты) изучали с помощью специфических реакций на *MAP-2* микротрубочек, а цитоскелета астроцитов – реакции на *GFAP* промежуточных филаментов. Распределение синаптических терминалей вокруг нейронов изучали с помощью реакции на синаптофизин (*p38*) и каспазу-3 (*CASP3*). Каспаза-3, являясь плейотропным ферментом, принимает активное участие не только в реализации апоптоза (перикарион), но и в процессе синаптической пластичности (синаптические терминали) [41; 61]. Микроглиоциты верифицировали с помощью специфической для этих клеток реакции на *AIF-1* (аллотрансплантат воспалительного фактора 1), также известный как ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1 (*IBA1*). Пролиферативную активность клеток оценивали с помощью реакции на белок *Ki67*, апоптоз – на *bcl-2*, *p53* и каспаза-3.

Для иммуногистохимического исследования использовали к *NSE* – нейрон специфической енолазе (PAA537Ra01)-кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 : 100; *HSP-70* – белку теплового шока (PAB062Ra01) – кроличьи поликлональные антитела к крысиному антигену; разведение 5–20 мкг/мл (Cloud-Clone Corp.); *MAP-2* -белок, ассоциированный с микротрубочками 2 (ab32454) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (Abcam, США); *GFAP* -кислему фибриллярному белку астроцитов (PA0026) – мышинные моноклональные антитела, клон GA5, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания); *p38* –синаптофизин (PA0299) – мышинные моноклональные антитела, клон 27G12, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания); *CASP3*-каспаза 3 (Mob 309) – мышинные моноклональные антитела, клон 3CSP03, разведение 1:25 (Diagnostic Bio Systems Inc., США); *AIF-1*-аллотрансплантат воспалительного фактора (PAC288Ra01) –

кроличьи поликлональные антитела, разведение 5–20 мкг/мл (Cloud-Clone Corp.); Bcl-2 – ингибитор каспаз (bcl-2/100/D5) – мышинные поликлональные антитела, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания); Ki-67 – маркер пролиферативной активности (MM1) – мышинные поликлональные антитела, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания); p53 – проапоптотический белок (клон DO-7) – мышинные поликлональные антитела, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Иммуногистохимическую реакцию проводили на срезах, помещенных на полилизинные предметные стекла. После реакции с первичными антителами срезы инкубировали с соответствующими вторичными антителами, хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол. Для визуализации использовали мультимерный набор реагентов на основе полимера Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

Иммуногистохимическую реакцию проводили на срезах, помещенных на полилизинные предметные стекла. После реакции с первичными антителами срезы инкубировали с соответствующими вторичными антителами, хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол. Для визуализации использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

В процессе приготовления препаратов применяли: набор реагентов для детекции (Bond Polymer Refine Detection, DS9800), отмывочный раствор (Bond Wash Solution 10X Concentrate, 1L), растворы для высокотемпературной демаскировки (Bond Epitope Retrieval), раствор для разведения антител (Bond Primary Antibody Diluent), раствор для депарафинизации (Bond Dewax Solution) (производитель: Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

Анализ изображений. Препараты готовили согласно рекомендациям фирмы производителя реагентов, затем фотографировали на микроскопе Leica DM 1 000

(камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size $1.4 \times 1.4 \mu\text{m}$), изображение сохраняли в файлах с расширением tiff ($2\,592 \times 1\,944$ пикселей), затем в Photoshop CC размерность увеличивали (до $3\,780 \times 2\,835$ пикселей/см, разрешение 600 пикселей/дюйм).

Для достижения максимальной контрастности и четкости мелких отростков астроцитов проводили коррекцию изображения с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость). Например, последнее позволяло выявлять самые мелкие частицы *GFAP*-позитивного материала, что необходимо для применения фрактального анализа изображений ветвящихся клеток. Определение относительной площади иммунопозитивных меток (частиц) при морфометрическом исследовании проводили на масках 8-битовых черно-белых изображений (объектив $\times 40$, $\times 100$) с использованием программы ImageJ 1.53c. Перед морфометрическим анализом (апплет Analyze Particles) изображения осуществляли его визуальную настройку с помощью апплета Image (Adjust). Устанавливали стандартный для всех изображений порог отсечения (Threshold).

Фрактальный анализ контуров астроцитов на полученных черно-белых изображениях осуществляли с помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods) по разработанным ранее подходам [145].

Маски и контуры *GFAP*-позитивных тел и отростков на бинарных изображениях представлены как срезы единой объемной сети в плоскости фрактального пространства. Поэтому эти клетки с геометрически сложной и нерегулярной организацией количественным образом можно охарактеризовать только путем определения фрактальной размерности (*FD*). В результате получена информация о заполнении нервной ткани фрактальной структурой (в частности, ветвящимися отростками астроцитов) и мерой сложности пространственной организации астроцитов. Подобный подход ранее применялся для характеристики глиальных клеток головного мозга млекопитающих [108].

FD масок типичных астроцитов серого вещества гиппокампа и неокортекса, включающих в плоскости среза (толщина 4 мкм) только тела клеток и их отростки 1-2 порядка, варьировала в пределах 1,35–1,50. При этом *FD* их внешнего

контура: 1,29–1,42 (Рисунок 3а, б).

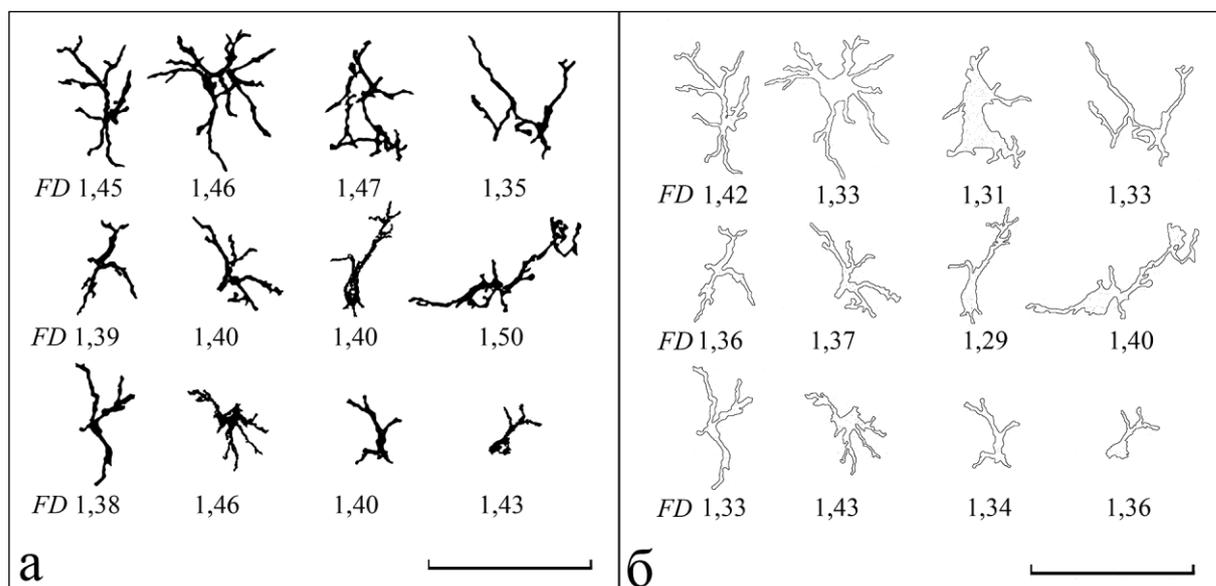


Рисунок 3 – Фрактальные размерности (FD) отдельных масок (а) и контуров (б) различных астроцитов гиппокампа и неокортекса животных контрольной группы, полученные на основе расчетных данных с использованием модуля для фрактального анализа бинарных изображений FracLac 2.5 в программе ImageJ 1.53с: а-Me = 1,42 (Q1 = 1,40, Q3 = 1,46); б-Q2 = 1,35 (Q1 = 1,33, Q3 = 1,39).

Коэффициент корреляции (r^2) для линии регрессии = 0,992–0,995.

Объектив: $\times 40$, шкала – 50 мкм

Таким образом, *FD* отдельных астроцитов (включающих только отростки 1-2 порядка) неокортекса оказалась дробной, промежуточной между целочисленными значениями топологической размерности клеточного отростка как линии ($FD = 1$) и двумерного пространства ($FD = 2$), заполняемого ветвящимися отростками астроцита.

Фрактальный анализ можно использовать не только для отдельных астроцитов, но и более сложных рельефов, например, всего поля зрения ROI, включающего тела, крупные (1-2 порядка) и мелкие (3-4 порядка) отростки. В этом случае измерения закономерно показали более высокие значения *FD* и

позволил оценить лакуарность (Λ) астроцитарной сети разных отделов гиппокампа (CA_1 , CA_3 , CA_4 и зубчатая извилина). Таким образом, при анализе больших полей зрения *GFAP*-позитивного материала увеличение FD (по сравнению с одним астроцитом) происходило, вероятно, за счет включения в изображение мелких периферических (дистальных) отростков астроцитов. Это имело большое значение, так как позволило охарактеризовать наиболее подвижные и пластичные отделы астроцитов. Показать в сравнительном аспекте влияние 20 мин ООСА на форму и разветвленность тонких отростков в нейропиле.

В гиппокампе определяли относительную площадь *GFAP*-позитивного материала в поле зрения (по 25 полей зрения на каждый срок), фрактальную размерность (FD – показатель заполнения пространства фрактальной структурой) и лакуарность (Λ – мера неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой) для астроцитов. В используемом алгоритме ImageJ 1.53с фрактальная размерность вычислялась по формуле:

$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \frac{\ln N_{\varepsilon}}{\ln \varepsilon},$$

где ε – размер ячейки сетки;

N_{ε} – количество ячеек размера ε , содержащих пиксели изображения астроцита.

Лакуарность вычислялась по формуле:

$$\Lambda = (\sigma / \mu)^2,$$

где σ – стандартное отклонение массы (для бинарного изображения – количество пикселей) фрактальной структуры в ячейках сетки заданного размера ε ;

μ – среднее значение массы структуры в ячейках заданного размера ε .

Мерой лакуарности (Λ) в использованной программе (FracLac 2.5) являлось изменение плотности изображения *GFAP*-позитивного материала

астроцита при сканировании сеткой с ячейками различных размеров [70; 145; 229]. Чем выше лакунарность, тем больше в изучаемом распределении имеется областей без *GFAP*.

Количественное изучение межнейронных синаптических контактов проводили с помощью иммуногистохимического типирования *p38*, белка, связанного с синаптическими пузырьками. Световая микроскопия позволяет хорошо распознавать крупные терминалы, не говоря уже о гигантских терминалах CA_3 гиппокампа. На каждый срок использовали по 25 случайно выбранных полей зрения CA_1 и CA_3 гиппокампа (объектив: $\times 100$). С помощью специально написанного макроса в программе ImageJ выделяли на этих фотографиях области интереса: 25×25 мкм и помещали их в стеки; затем осуществляли процедуру рандомизации зон интереса с помощью генератора случайных чисел (Statistica 8.0) и отбирали на каждый срок по 50 изображений. На этих изображениях проводили морфометрический анализ. Цветные изображения (иммунотипирование *p38*) трансформировали в бинарные, на которых определяли («*Analyze Particles*») относительную площадь и численную плотность синаптических терминалов (на 1 мм^2) в CA_1 , *stratum lucidum* и слое пирамидных нейронов CA_3 . Таким образом, в итоге каждый вариационный ряд, отражающий характеристики терминалов одного срока, состоял из 50 измерений.

Статистический анализ. По литературным данным, в нейроморфологии для получения достоверных результатов достаточно 6–8 животных в группе, 5–6 серийных срезов и 5–10 случайных полей зрения объекта (отдела головного мозга) на каждом срезе [81; 241]. В настоящем исследовании мы сравнивали по 25 рандомизированных полей зрения на срок.

Оценку характера распределения указанных величин проводили с помощью критерия Shapiro-Wilk (Statistica 8.0), проверку статистических гипотез - с помощью непараметрических методов. Первоначально использовали критерий для множественного сравнения (ANOVA Kraskel-Wallis). При получении статистически значимого результата проводили парное сравнение с помощью Mann – Whitney U-test для независимых выборок. Использовались также критерий

χ^2 и Фишера. Материал представлен в процентах (95 % доверительный интервал – 95 % ДИ), как медиана ($Q2$) нижний ($Q1$) и верхний ($Q3$) квартили (StatSoft Statistica 8.0; MedCalc 11.6.1.0) [9]. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Цитоархитектоника гиппокампа в норме и после 20 минутной окклюзии общих сонных артерий

Гиппокамп (аммонов рог, CA₁-CA₃) представляет собой сложную систему клеток, их отростков и нейропиля. Плотная лента ее клеток тянется в переднезаднем направлении вдоль медиальной стенки нижнего рога бокового желудочка мозга. В гиппокампе выделяют 3 основных клеточных слоя: полиморфный, слой пирамидных нейронов и молекулярный слой (Рисунок 4).

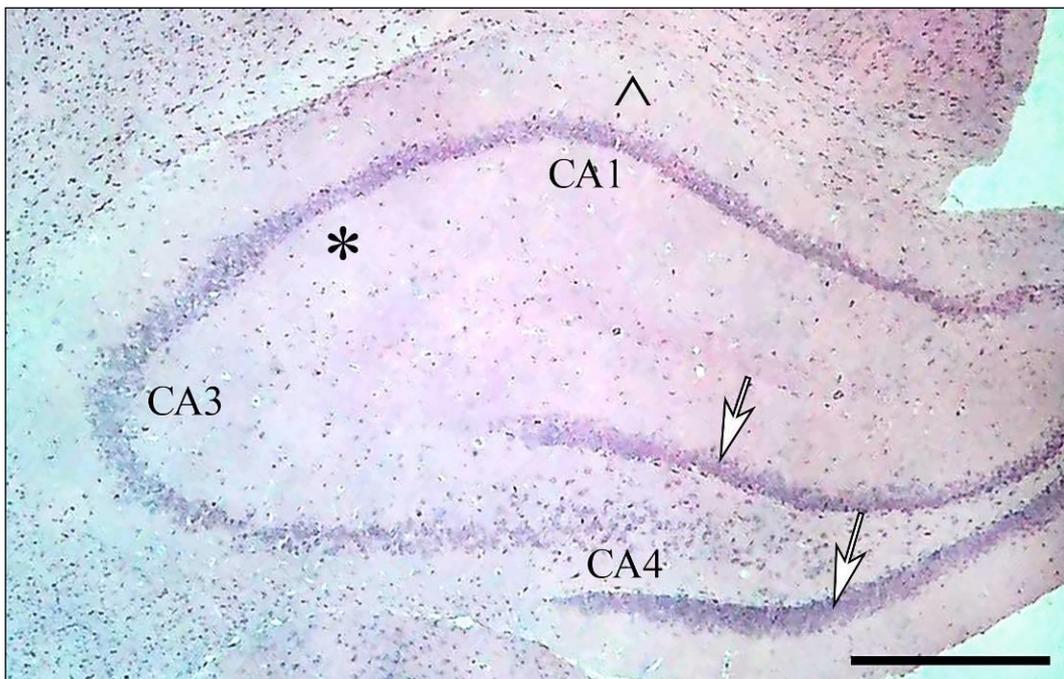


Рисунок 4 – Гиппокампальная формация белой крысы в контроле: экранное образование, выделяется молекулярный слой (*), слой пирамидных нейронов (поля CA₁, CA₃), полиморфный слой (^). Стрелки – зубчатая извилина (*gyrus dentatus*, извилина). Окраска: гематоксилин-эозином, объектив × 4, шкала – 500

МКМ

Стволы апикальных дендритов располагаются в *stratum radiatum*,

претерминальные и терминальные ветвления апикальных дендритов – в *stratum lacunosum* молекулярного слоя (Рисунок 5). В зоне апикальных дендритов пирамидных нейронов поля CA_3 выделялась *stratum lucidum*. По данным литературы [19], она представлена апикальными участками дендритов пирамидных нейронов и гигантскими терминалями синапсов, сформированных аксонами мшистых волокон. В CA_1 выявлялись небольшие, плотно расположенные в 2 ряда пирамидные нейроны, в CA_3 нейроны крупные, расположены рыхло, в зубчатой извилине – мелкие зернистые, располагались очень плотно. Апикальные дендриты пирамидных нейронов CA_1 прослеживались на значительном расстоянии от клетки в виде единого ствола (см. Рисунок 5). Таким образом, дендроархитектоника CA_1 , CA_3 и зубчатой извилины значительно отличается.

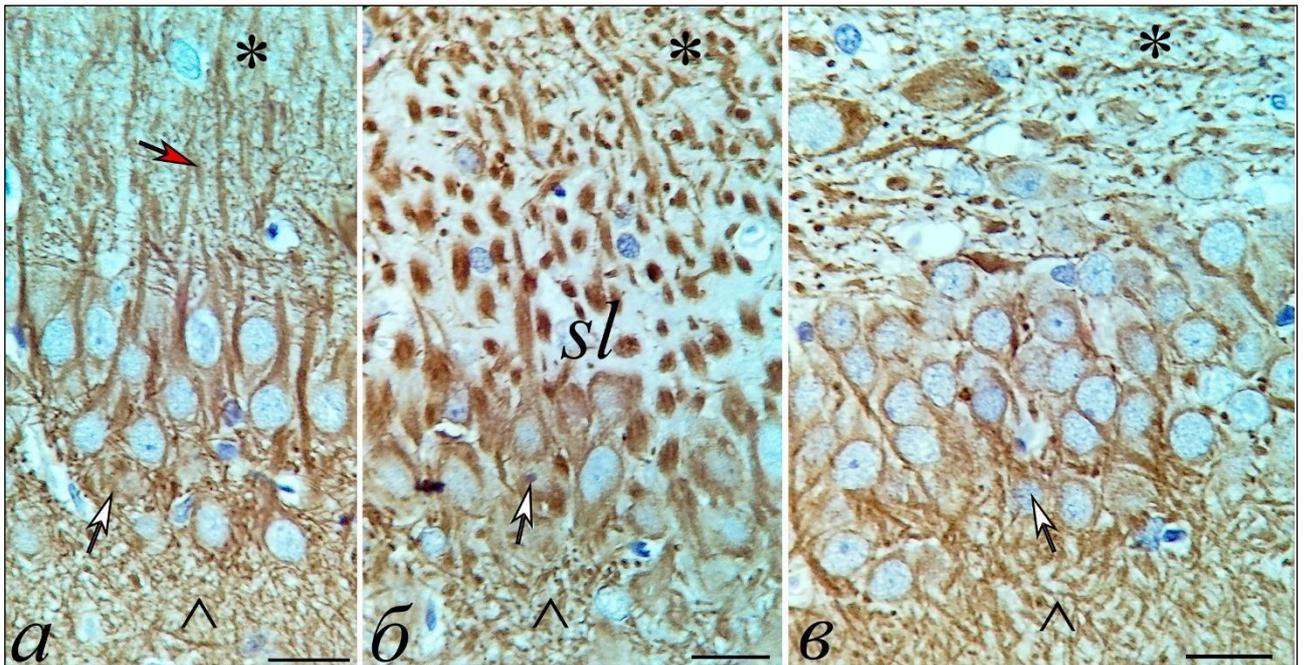


Рисунок 5 – Поля CA_1 (а), CA_3 (б) гиппокампа и зубчатая извилина (в) контрольных белых крыс: неразветвленные апикальные дендриты (красная стрелка) в *stratum radiatum* CA_1 , *stratum lucidum* в молекулярном слое (*) CA_3 .

Белые стрелки – пирамидные нейроны, ^ – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимия, типирование MAP-2. Докраска гематоксилином, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм

Во всех отделах гиппокампа на фоне неизмененного нейропиля преобладали типичные нормохромные нейроны с круглым светлым ядром, содержащим узкий ободок базофильного вещества и крупное ядрышко. Цитоплазма таких нейронов имела бледно-розовое окрашивание (слабая эозинофилия) (Рисунок 6а, б). Выявлялись единичные темные дегенеративно измененные нейроны (см. Рисунок 6в).

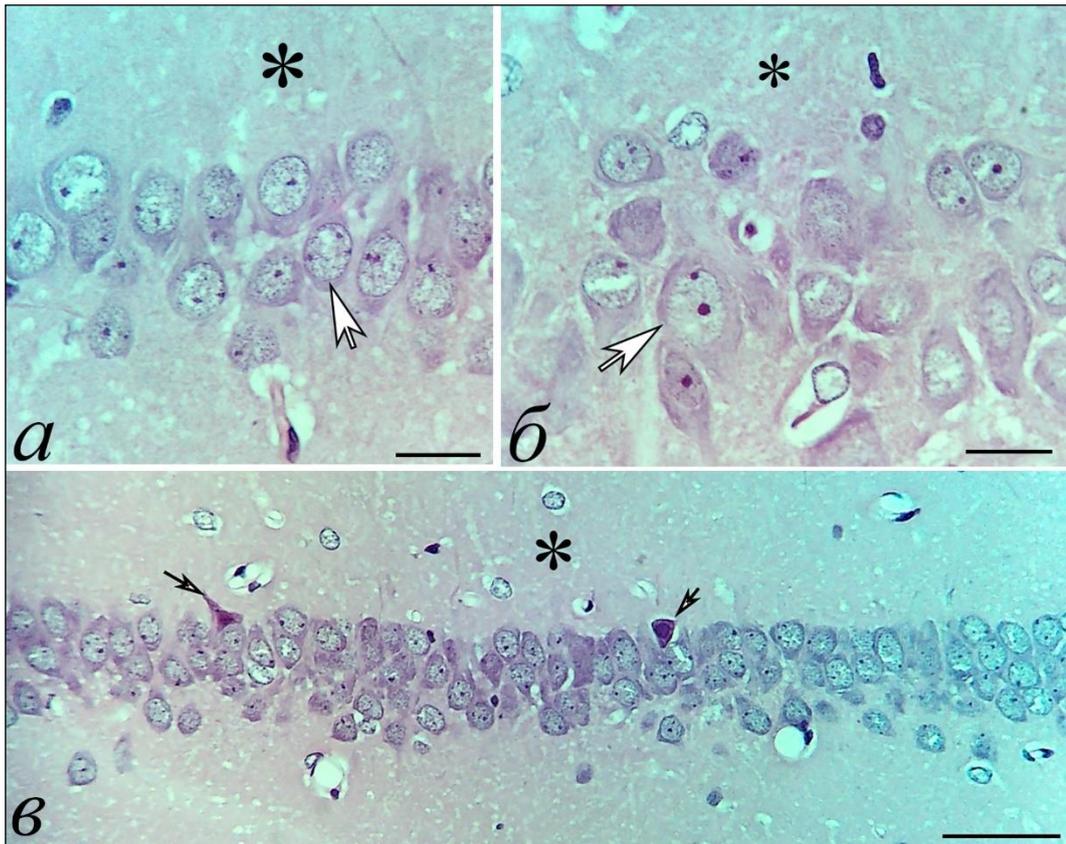


Рисунок 6 – Поля CA₁ (а, в) и CA₃ (б) гиппокампа контрольных животных: преобладают нормохромные нейроны (большие стрелки), видны единичные нейроны с признаками коагуляционно-ишемического некроза (мелкие стрелки). Окраска гематоксилин-эозином, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм (а, б), $\times 40$, шкала – 50 мкм (в)

Через 1 и 3 сут после 20 мин ООСА в гиппокампе выявлялись пирамидные

нейроны с признаками тинкториальных (усиление и уменьшение интенсивности окраски цитоплазмы и ядра – гиперхромные и гипохромные), гидropических (вакуолизация, отек-набухание), дегидратационных (темные клетки с обратимым сморщиванием) и некробиотических (клетки-тени, пикноморфные, гомогенизированные клетки) изменений, фагоцитоза и мелкие поля «выпадения» нейронов. При этом, среди необратимо поврежденных преобладали нейроны с признаками коагуляционно-ишемического некроза – пикноморфные темные (красные) нейроны (Рисунок 7). В молекулярном слое появлялись контуры окрашенных эозином апикальных дендритов (Рисунок 8б, в, д). Нейроглиальные взаимоотношения характеризовались увеличением количества единичных, групп астроцитов и микроглиоцитов около патологически измененных нейронов (см. Рисунок 7б).

Выявленные изменения гиппокампа имели мелкоочаговый характер. Дегенеративно измененные нейроны перемежались с типичными нормохромными нейронами. Встречались участки гиппокампа с преобладанием нормохромных нейронов и участки, заполненные преимущественно темными нейронами. Степень сморщивания также варьировалась (см. Рисунок 8).

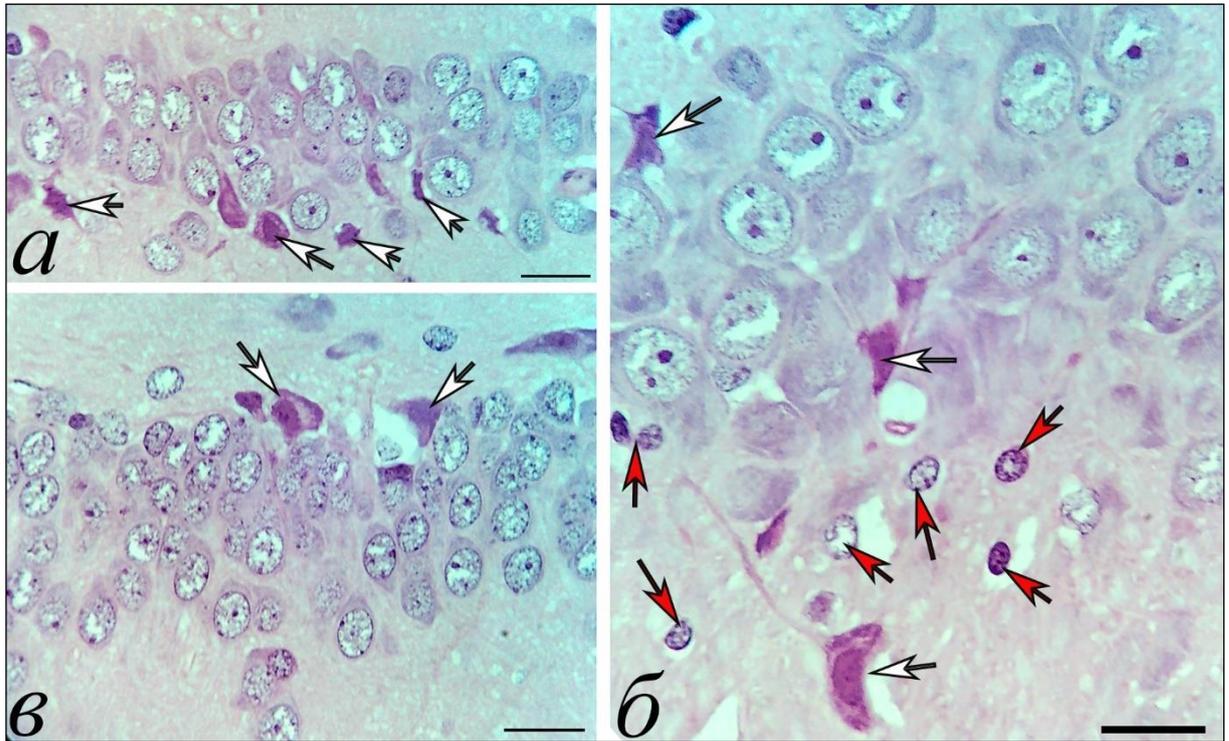


Рисунок 7 – Поля CA₁ (а), CA₃ (б) гиппокампа и зубчатая извилина (в) через 1 сут после 20 мин ООСА: появляются нейроны с признаками коагуляционно-ишемического некроза (белые стрелки), большое количество глиальных клеток (красные стрелки). Окраска гематоксилин-эозином, объектив × 100, шкала – 20 мкм

Представленные выше темные нейроны соответствуют классическому внешнему виду необратимой прижизненной нейрональной дегенерации, описываемой в литературе как «пикноморфный нейрон», «острая эозинофильная дегенерация нейронов», «коагуляционный некроз», «красные мертвые нейроны». Для этих нейронов было характерно: уменьшение объема перикариона, утрата базофильного вещества, интенсивная эозинофилия цитоплазмы, мелкие и сморщенные темноокрашенные пикнотические ядра, которые в конечном итоге подвергаются кариорексису. Отмечается разная степень гомогенизации ядра и цитоплазмы (см. Рисунки 7 и 8). Подобные нейроны выявлены на протяжении всего изученного периода (Рисунки 8, 9 и 10).

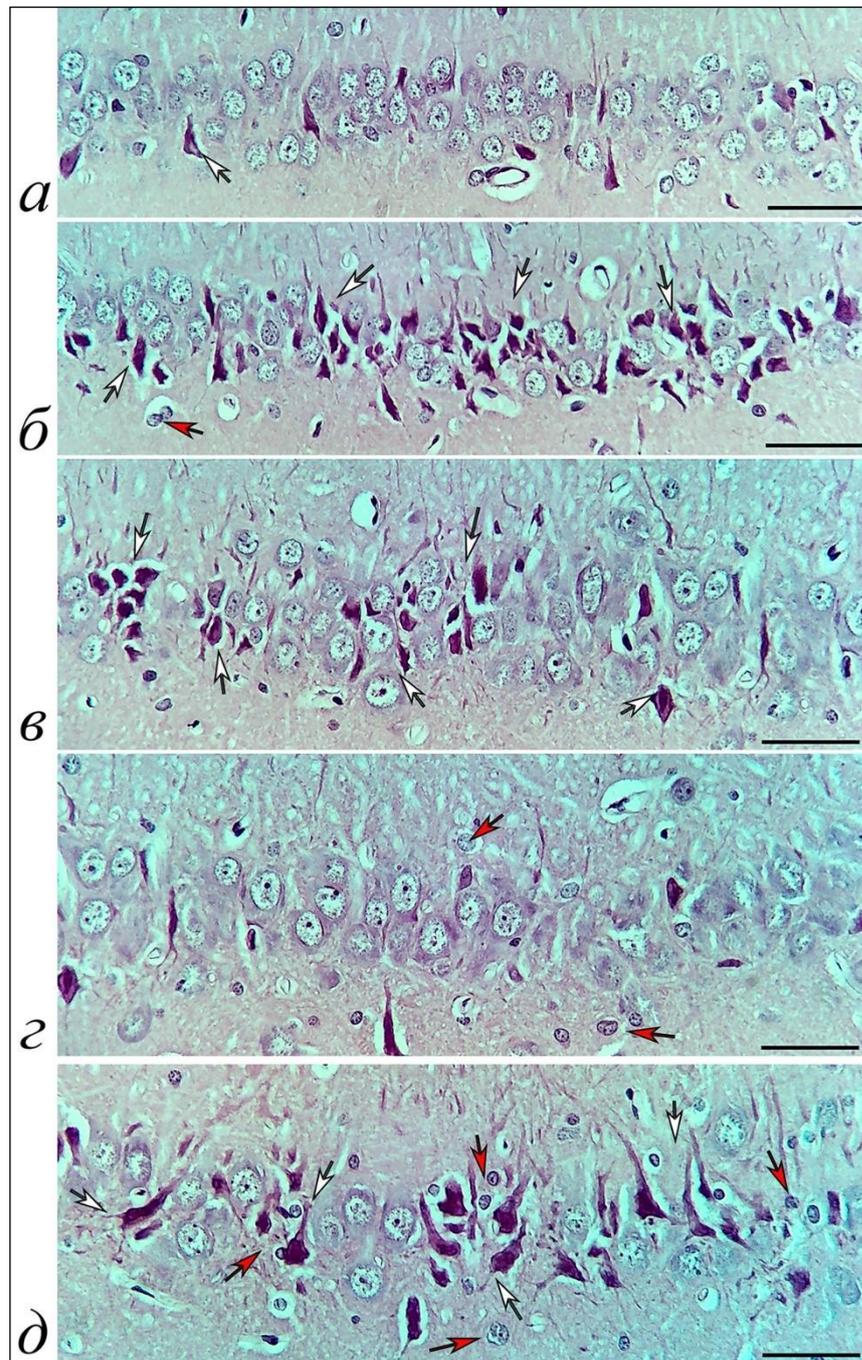


Рисунок 8 – Поля CA₁ (а, б), CA₃ (в, г) и CA₄ (д) гиппокампа через 1 сут после 20 мин ООСА: очаговые дегенеративные изменения нейронов, преобладают коагуляционно-ишемические (белые стрелки), очаговые скопления глиальных клеток (красные стрелки). Окраска гематоксилин-эозином, объектив × 40, шкала – 50 мкм

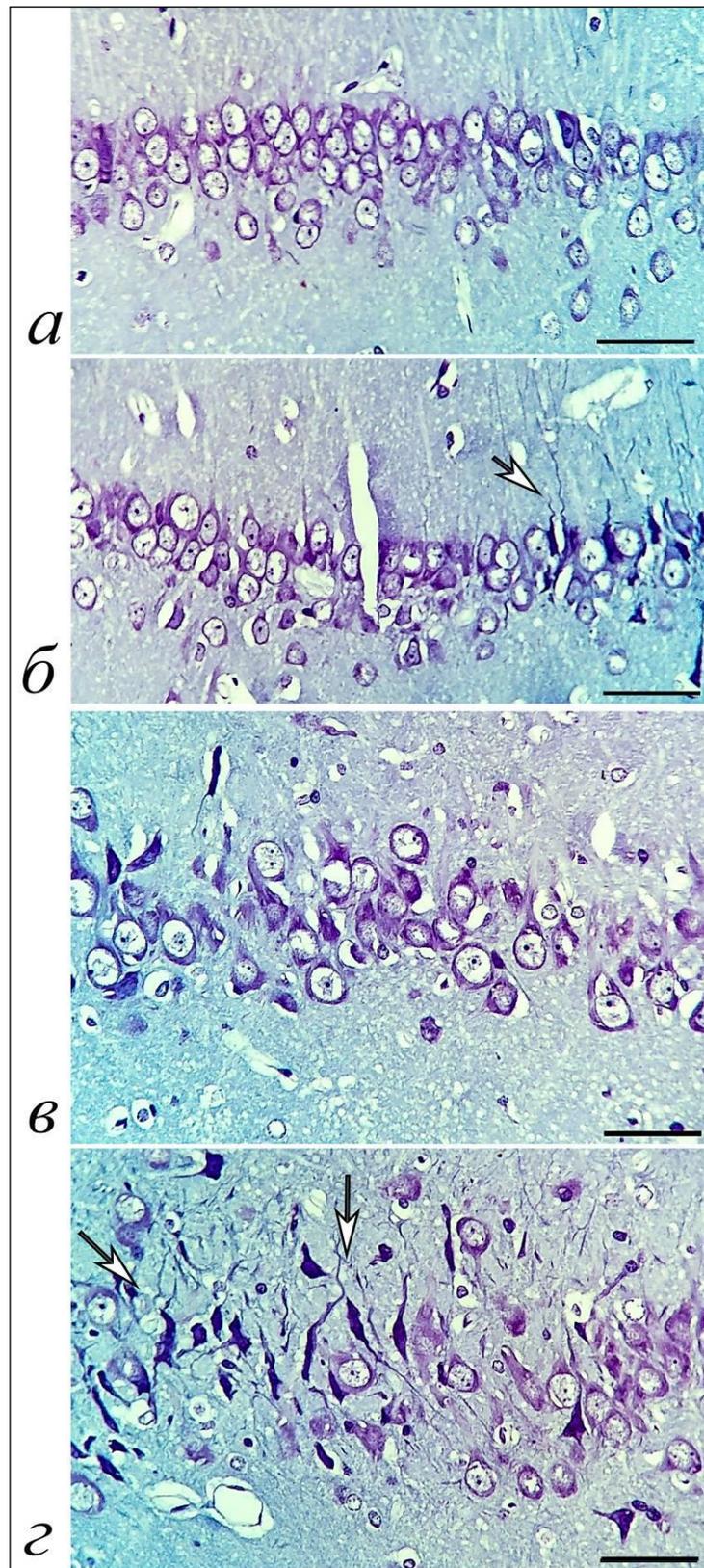


Рисунок 9 – Поля CA₁ (а, б), CA₃ (в) и CA₄ (г) гиппокампа через 3 сут после 20 мин ООСА: сохраняются очаговые дегенеративные изменения нейронов, коагуляционно-ишемического типа (белые стрелки). Окраска по Нисслю, объектив × 40, шкала – 50 мкм

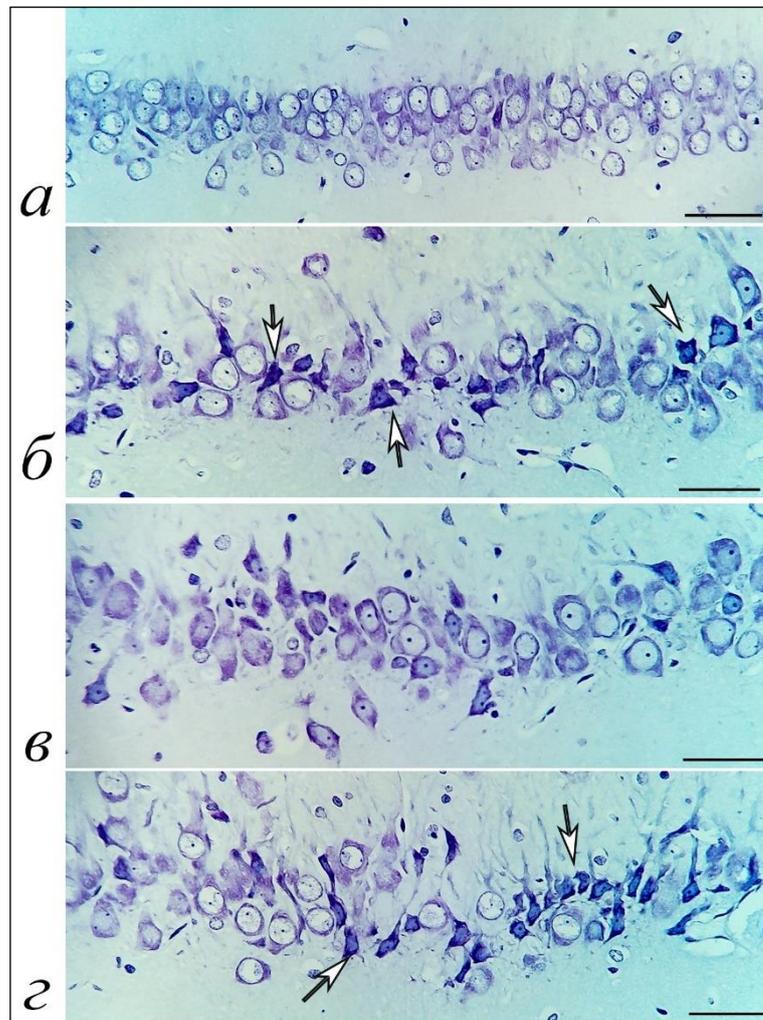


Рисунок 10 – Поля CA₁ (а), CA₃ (б, в) и CA₄ (г) гиппокампа через 14 сут после 20 мин ООСА: сохраняются очаговые дегенеративные изменения крупных пирамидных нейронов, коагуляционно-ишемического типа (белые стрелки).

Окраска по Нисслю, объектив × 40, шкала – 50 мкм

Нейропиль, прилегающий к дегенерирующим нейронам, вакуолизирован в результате набухания астроцитарных и нейрональных отростков. Соседние темные нейроны часто находились на разных стадиях дегенерации и сморщивания. В зоне дегенеративного изменения нейронов увеличивалось содержание астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов (см. Рисунки 7б и 8г, д). Все это свидетельствовало о прижизненности найденных нами изменениях нейронов.

Через 7, 14 и 30 сут после 20 мин ООСА в гиппокампе выявляли единичные

нейроны с проявлениями кариоцитолитического отека-набухания и вакуолизации перикарионов, но сохранялось большое количество пикноморфных нейронов. Максимальное содержание таких нейронов отмечалось в поле CA₄ (см. Рисунок 10). Выявлялись очаги выпадения нейронов, около ишемически измененных нейронов либо отдельно, либо в составе группы с астроцитами располагались микроглиоциты. Отмечалось увеличение количества сателлитарных олигодендроцитов (см. Рисунок 10).

Очаговое появление после 20 мин ООСА большого количества темных нейронов сопровождалось увеличением количества ядрышек в ядрах неповрежденных нормохромных нейронов (Рисунок 11, Таблица 1).

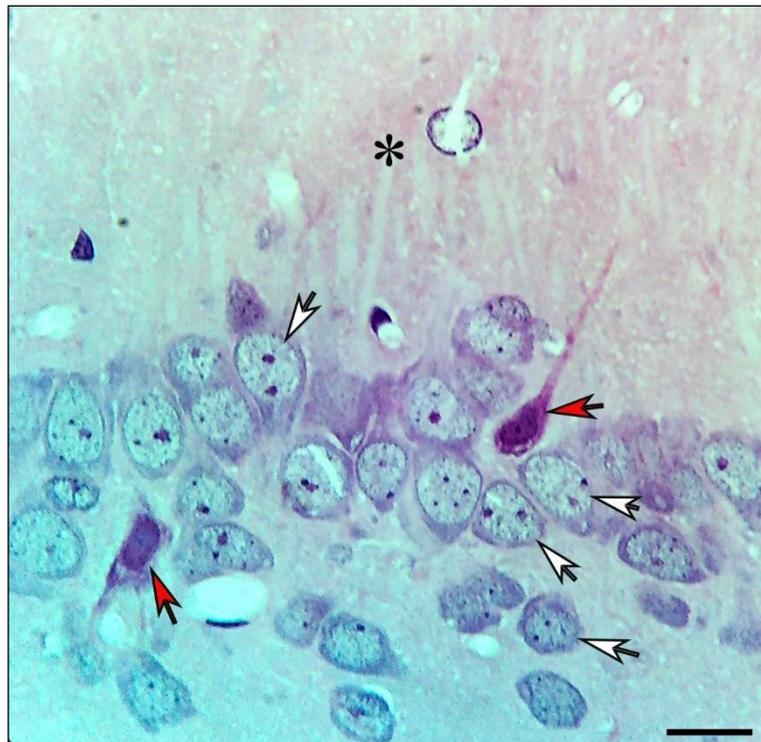


Рисунок 11 – Нейроны поля CA₃ гиппокампа с разным количеством ядрышек через 3 сут после 20 мин ООСА: увеличение доли нейронов с двумя ядрышками (белая стрелка). Красная стрелка – гиперхромные пикноморфные нейроны.

Окраска: гематоксилин-эозином, объектив × 100, шкала – 20 мкм

Вполне вероятно, что в течение 7 сут после острой ишемии в нейронах

гиппокампа происходил сдвиг в хромосомном балансе ядер и повышалась активность имеющихся ядрышковых организаторов. В течение данного времени это обеспечивало повышение уровня адаптации нейронов после 20 мин ООСА. Через 14 сут после 20 мин ООСА, вероятно, за счет слияния ядрышек, происходило восстановление их количества до уровня контроля (см. Таблицу 1).

Таблица 1 – Доля нейронов, имеющих два и более ядрышка гиппокампе белых крыс в норме и постишемическом периоде

Группа	Отдел		Сравнение между полями
	CA ₁	CA ₃	
Контроль	17/200	30/200	$\chi^2 = 3,5; p = 0,06$
1 сут	38/200 $\chi^2 = 8,4; p = 0,004^*$	64/200 $\chi^2 = 15,1; p = 0,0001^*$	$\chi^2 = 8,2; p = 0,004$
3 сут	46/200 $\chi^2 = 14,8; p = 0,0001^*$ $\chi^2 = 0,7; p = 0,4^\wedge$	88/200 $\chi^2 = 39,1; p < 0,0001^*$ $\chi^2 = 5,6; p = 0,02^\wedge$	$\chi^2 = 18,9; p < 0,0001$
7 сут	30/200 $\chi^2 = 3,5; p = 0,06^*$ $\chi^2 = 3,7; p = 0,06^\wedge$	50/200 $\chi^2 = 8,6; p = 0,003^*$ $\chi^2 = 10,1; p = 0,002^\wedge$	$\chi^2 = 5,6; p = 0,02$
14 сут	14/200 $\chi^2 = 0,14; p = 0,7^*$ $\chi^2 = 5,8; p = 0,02^\wedge$	26/200 $\chi^2 = 0,2; p = 0,6^*$ $\chi^2 = 12,0; p = 0,001^\wedge$	$\chi^2 = 3,4; p = 0,07$
30 сут	16/200 $\chi^2 = 0,0; p = 1,0^*$ $\chi^2 = 0,0; p = 1,0^\wedge$	24/200 $\chi^2 = 0,5; p = 0,5^*$ $\chi^2 = 0,03; p = 0,9^\wedge$	$\chi^2 = 1,4; p = 0,24$
Примечание: Различия статистически значимы в сравнении с контролем (*) и предыдущим сроком (^) при $p < 0,05$ (критерий χ^2). В каждом сроке оценивали по 200 нейронов.			

Таким образом, после 20 мин ООСА ядрышковый аппарат части поврежденных пирамидных нейронов гиппокампа в остром периоде подвергался инактивации, но параллельно активировались процессы адаптации нормохромных нейронов, которые проявлялись, в частности, гипертрофией и амплификацией

ядрышек. Это, вероятно, обеспечивало усиление рибосомного синтеза, регенерацию частично поврежденных и защиту функционирующих нейронов. Максимальная активация ядрышкового аппарата отмечалась в поле СА₃ гиппокампа.

Ранее на использованной мною модели ишемии показано, что процесс утилизации saniрующей клеточной системой погибших нейронов после 20 мин окклюзии общих сонных артерий происходил на протяжении всего изученного восстановительного периода (30 сут). Несмотря на то, что через 30 сут большая часть остатков необратимо поврежденных нейронов (перикарион и отростки) была полностью утилизирована, сохранялись разнообразные гиперхромные нейроны и пикноморфные нейроны с крайней степенью дегидратации [50]. В настоящей работе подтверждается значительная продолжительность структурной реорганизации белок-синтетического аппарата в ответ на непродолжительную неполную острую ишемию головного мозга.

3.2 Морфометрическая характеристика изменений цитоархитектоники гиппокампа после 20 мин окклюзии общих сонных артерий.

По данным анализа препаратов, окрашенных тионином и гематоксилин-эозином, в остром периоде (1 и 3 сут) в поле СА₃ превалировали гидропические и гиперхромные обратимые изменения нервной ткани. Однако встречались участки СА₃, в которых 60–80 % (95 % ДИ) нейронов имели признаки некробиотических пикноморфных изменений. В необратимо измененных пикноморфных нейронах дегидратация, конденсация, гомогенизация хроматофильного вещества ядра и цитоплазмы достигали крайней степени, сопровождалась «исчезновением» ядрышка и выраженным уменьшением объема клеток. Максимальное количество очагов таких нейронов выявлено через 3 сут после 20 мин ООСА на фоне умеренных проявлений отека-набухания нервной ткани (Таблицы 2, 3 и 4). Клетки-тени встречались редко.

Через 7 и 14 сут после 20 мин ООСА, в сравнении с острым периодом

(1 и 3 сут), содержание нормохромных нейронов частично восстанавливалось (см. Таблицу 2). При этом общая численная плотность нейронов в течение 14 сут наблюдения (начиная с 3-х сут) статистически значимо уменьшалась: после 20 мин ООСА на 16,3 % (см. Таблицу 3). То есть, часть пирамидных нейронов СА₃ после 20 мин ООСА подвергалось необратимым изменениям или полностью разрушалось и элиминировалось путем фагоцитоза. Необходимо отметить, что значительно увеличивался разброс значений общей численной плотности нейронов в разных полях зрения (см. Рисунки 8, 9 и 10). Это свидетельствовало о явных очаговых проявлениях полиморфизма изначально однотипных по структуре пирамидных нейронов поля СА₃.

Таблица 2 – Доля нормохромных пирамидных нейронов (из 200 верифицированных по ядрышку на каждый срок в группе) в поле СА₃ гиппокампа белых крыс в норме, после 20 мин ООСА и ТЧМТ

Подгруппы	СА ₃
Контроль	185/200
1 сут	46/200; $\chi^2 = 195,1$; $p < 0,0001^*$
3 сут	54/200; $\chi^2 = 175,7$; $p < 0,0001^*$; $\chi^2 = 0,65$; $p = 0,42^\wedge$
7 сут	78/200; $\chi^2 = 124,7$; $p < 0,0001^*$; $\chi^2 = 6,0$; $p = 0,015^\wedge$
14 сут	152/200; $\chi^2 = 19,3$; $p < 0,0001^*$; $\chi^2 = 54,5$; $p < 0,0001^\wedge$
Примечание: * – парное сравнение с контролем, ^ – сравнение с предыдущим сроком. Различия статистически значимы при $p < 0,05$. Материал представлен как доля от 200.	

Таблица 3 – Общая численная плотность пирамидных нейронов (на 1 мм²) в поле СА₃ гиппокампа белых крыс в норме, после 20 мин ООСА (по 50 полей зрения на каждый срок), Q2 (Q1-Q3) и Min-Max

Подгруппы	СА ₃
Контроль	1 601 (1 162–1 705); 1 222–1 865
1 сут	1 415 (1 243–1 534); 998–1 845; $p = 0,01^*$
3 сут	1 370 (1 155–1 381); 1 012–1 625; $p = 0,001^*$; $p = 0,02^{\wedge}$
7 сут	1 331 (1 141–1 387); 987–1 699; $p = 0,001^*$
14 сут	1 340 (1 127–1 398); 856–1 567; $p = 0,001^*$
30 сут	1 285 (924–1 488); 889–1 525; $p = 0,001^*$
ANOVA	$df = 4$; $H = 17,2$; $p = 0,03\&$
Примечание: * – парное сравнение с контролем, ^ – сравнение с предыдущим сроком (критерий Манна – Уитни), &-множественное сравнение по всем срокам (ANOVA Краскела-Уоллиса). Различия статистически значимы при $p < 0,05$. Учитывали только нейроны с ядрышком.	

О полиморфизме пирамидных нейронов роля СА₃ гиппокампа свидетельствовало также очаговое увеличение после 20 мин ООСА содержания клеток с 2-3 ядрышками (Таблица 5). Вероятно, что это связано с компенсаторной активацией белок-синтетической функции ядер устойчивых к ишемии пирамидных нейронов, необходимой для реализации механизмов нейропластичности на фоне частичного повреждения нервной ткани. В наибольшей степени последнее проявлялось в зонах высокого содержания неповрежденных нейронов (см. Таблицу 5).

Таблица 4 – Относительный объем (%) зон отека-набухания в поле СА₃ гиппокампа белых крыс в норме, после 20 мин ООСА (по 50 полей зрения на каждый срок), Q2 (Q1-Q3) и Min-Max

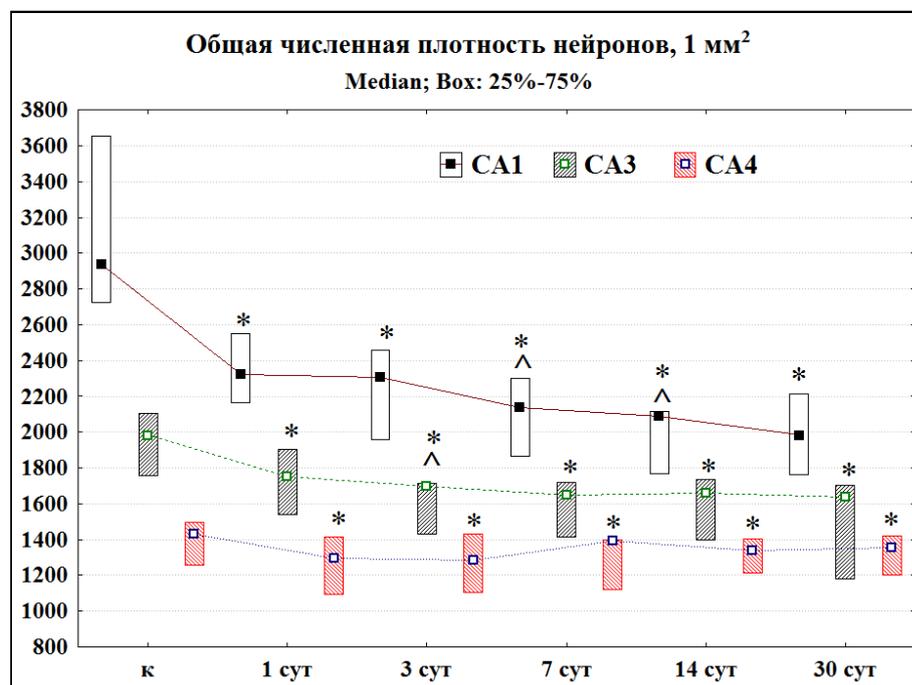
Подгруппы	СА ₃
Контроль	6,9 (6,1–7,4); 4,2–9,5
1 сут	8,1 (7,5–9,2); 7,2–10,1; $p = 0,001^*$
3 сут	10,3 (9,1–11,8); 8,3–14,7; $p = 0,001^*$; $p = 0,001^{\wedge}$
7 сут	8,2 (7,3–9,1); 6,8–10,5; $p = 0,001^*$; $p = 0,001^{\wedge}$
14 сут	7,3 (6,5–8,0); 6,1–11,3; $p = 0,02^{\wedge}$
ANOVA	df = 3; $N = 23,2$; $p = 0,01\&$
Прмечание: * – парное сравнение с контролем, ^ – сравнение с предыдущим (критерий Манна – Уитни), &-множественное сравнение по всем срокам (ANOVA Краскела – Уоллиса). Различия статистически значимы при $p < 0,05$.	

Таблица 5 – Доля пирамидных нейронов (из 200 верифицированных по ядрышку на каждый срок в группе) с двумя и более ядрышками в поле СА₃ гиппокампа белых крыс в норме, после 20 мин ООСА

Подгруппы	СА ₃
Контроль	30/200
1 сут	63/200; $\chi^2 = 14,4$; $p = 0,0002^*$
3 сут	88/200; $\chi^2 = 39,1$; $p < 0,0001^*$; $\chi^2 = 6,1$; $p = 0,013^{\wedge}$
7 сут	50/200; $\chi^2 = 5,6$; $p = 0,02^*$; $\chi^2 = 15,2$; $p = 0,0001^{\wedge}$
14 сут	26/200; $\chi^2 = 0,19$; $p = 0,7$; $\chi^2 = 8,6$; $p = 0,003^{\wedge}$
Примечание: * – парное сравнение с контролем, ^ – сравнение с предыдущим сроком (критерий χ^2). Различия статистически значимы при $p < 0,05$.	

Ранее в сравнительном анализе изменений неокортекса, архикортекса и миндалевидного тела белых крыс после 20 мин ООСА нами [4] были выявлены статистически значимые различия динамики уменьшения общей численной плотности нейронов в СА₁, СА₃ и СА₄ (Рисунок 12). Установлено, что основная масса необратимо поврежденных нейронов элиминировалась в течение 1 сут после 20 мин ООСА путем активации известных механизмов некроза и апоптоза,

рассмотренных нами, как ведущие, для данной модели острой ишемии [26; 36]. Первые 24 ч являются критическим после ишемического/травматического повреждения неокортекса и гиппокампа [241]. В более отдаленном периоде происходит саногенетическая очистка нервной ткани от грубых некробиотических остатков путем фагоцитоза микроглиоцитами и астроцитами. Это сопровождается перманентным разрушением и удалением только небольшой части отдельных дегенеративно измененных нейронов, в основном темных пикноморфных.



Примечание: * – различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – с предыдущим сроком (при $p < 0,05$; критерий Манна – Уитни). При множественном сравнении по срокам (ANOVA Краскела-Уоллиса) удалось отвергнуть нулевую гипотезу – CA₁ (df = 5; N = 19,2; p = 0,02); CA₃ (df = 5; N = 17,5; p = 0,03); CA₄ (df = 5; N = 15,5; p = 0,04).

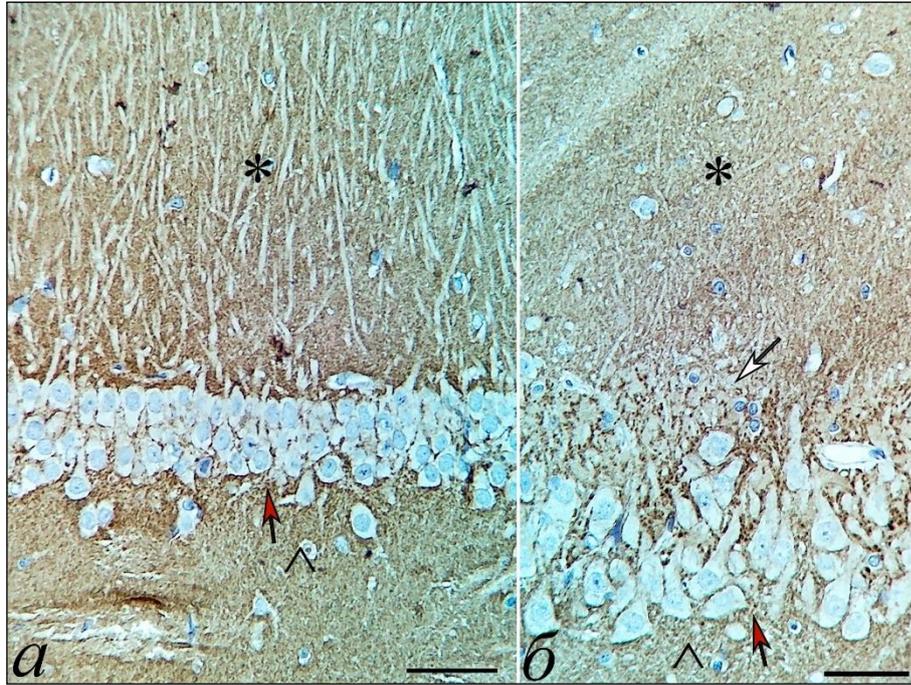
Рисунок 12 – Общая численная плотность пирамидных (CA₁ и CA₃) и полиморфных (CA₄) нейронов в гиппокампе белых крыс в норме и после 20 мин ООСА

В настоящей работе, при некотором изменении алгоритма подсчета нейронов (только нейроны с видимым ядрышком) нами получены аналогичные

результаты: 20 мин ООСА вызывала дегенеративные патоморфологические изменения пирамидных нейронов, что приводило к статистически значимому уменьшению их общей численной плотности. Максимально страдала популяция нейронов поля CA₁. Таким образом, функционирование гиппокампа головного мозга после 20 мин ООСА закономерно будет происходить на фоне компенсаторной реорганизации межнейронных взаимоотношений сохранившихся нейронов и реактивного нейроглиоза.

3.3 Иммуногистохимическое исследование структур межнейронной коммуникации нейронов гиппокампа

При иммуногистохимическом типировании синаптических терминалей и дендритов нейропилль молекулярного слоя был представлен однородным субстратом без структурных проявлений отека-набухания (Рисунок 13а, б).



Примечание: Белая стрелка – *stratum lucidum*, * – молекулярный слой, ^ – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимическая реакция, типирование *p38* (синаптофизин). Докраска гематоксилином, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм

Рисунок 13 – Фрагменты поля CA_1 (а) и CA_3 (б) гиппокампа головного мозга белых крыс в норме: вокруг тел и дендритов пирамидных нейронов (красные стрелки), в нейропиле (*) молекулярного и полиморфного (^) слоев располагается большое количество структурированного *p38*-позитивного материала – синаптические терминали; в *stratum radiatum* CA_1 расположены крупные не ветвящиеся апикальные дендриты

Вокруг нейронов (на перикарионе и апикальных дендритах в *stratum lucidum*) располагалось большое количество гигантских синаптических терминалей (*p38*-позитивные округлые структуры) (см. Рисунок 13б). В *stratum radiatum* и *lacunosum* молекулярного слоя гигантские терминали встречались очень редко. Тела и отростки пирамидных нейронов равномерно заполнены маркером (*MAP-2*) (Рисунок 14а, б).

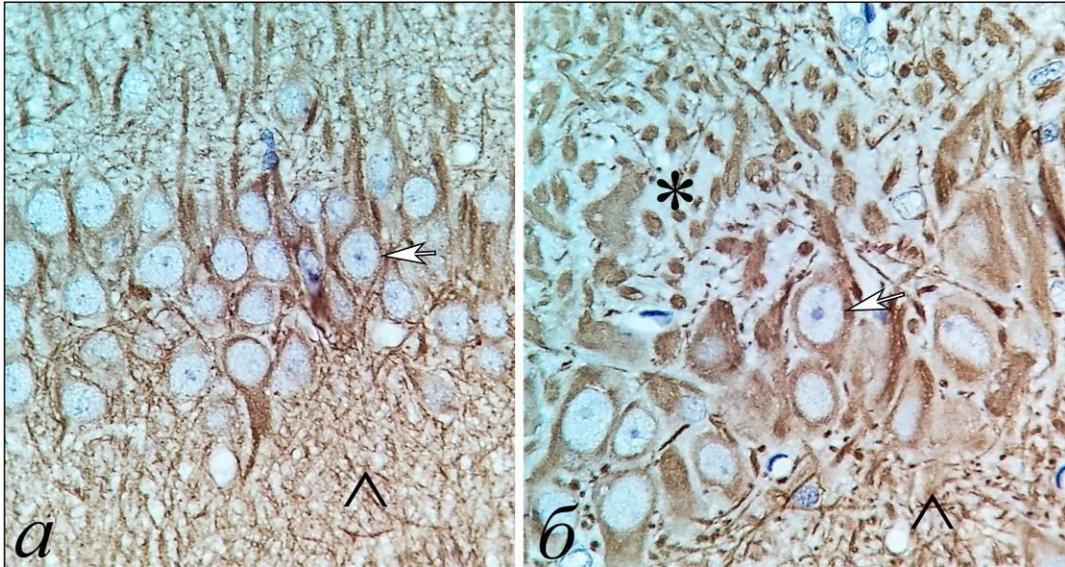


Рисунок 14 – Поля CA₁ (а) и CA₃ (б) гиппокампа контрольных белых крыс: демонстрация выявления и локализации *stratum lucidum* (*) в молекулярном слое CA₃. Стрелки – пирамидные нейроны, ^ – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимия, типирование MAP-2. Докраска гематоксилином, объектив × 100, шкала – 20 мкм

Таким образом, для молекулярного слоя поля CA₃ гиппокампа характерно наличие уникальной зоны – *stratum lucidum*, которая локализуется на уровне апикальных участков дендритов пирамидных нейронов и состоит из дендритов, гигантских синапсов, сформированных аксонами мшистых волокон, и небольшого количества отростков астроцитов. При окраске гематоксилин-эозином и по Нисслю *stratum lucidum* не отличалась от других уровней молекулярного слоя CA₃, выглядела, как и в CA₁. При иммуногистохимическом типировании (MAP-2) *stratum lucidum* была представлена в виде светлой полосы, содержащей срезы дендритов с MAP-2-позитивным материалом, над слоем тел пирамидных нейронов только в поле CA₃. Светлые участки соответствовали синаптическим гигантским терминалям, цитоскелет которых не содержал MAP-2-позитивный материал (см. Рисунок 14а, б). Более подробно CA₁ и CA₃ в сравнительном аспекте описаны нами ранее [42].

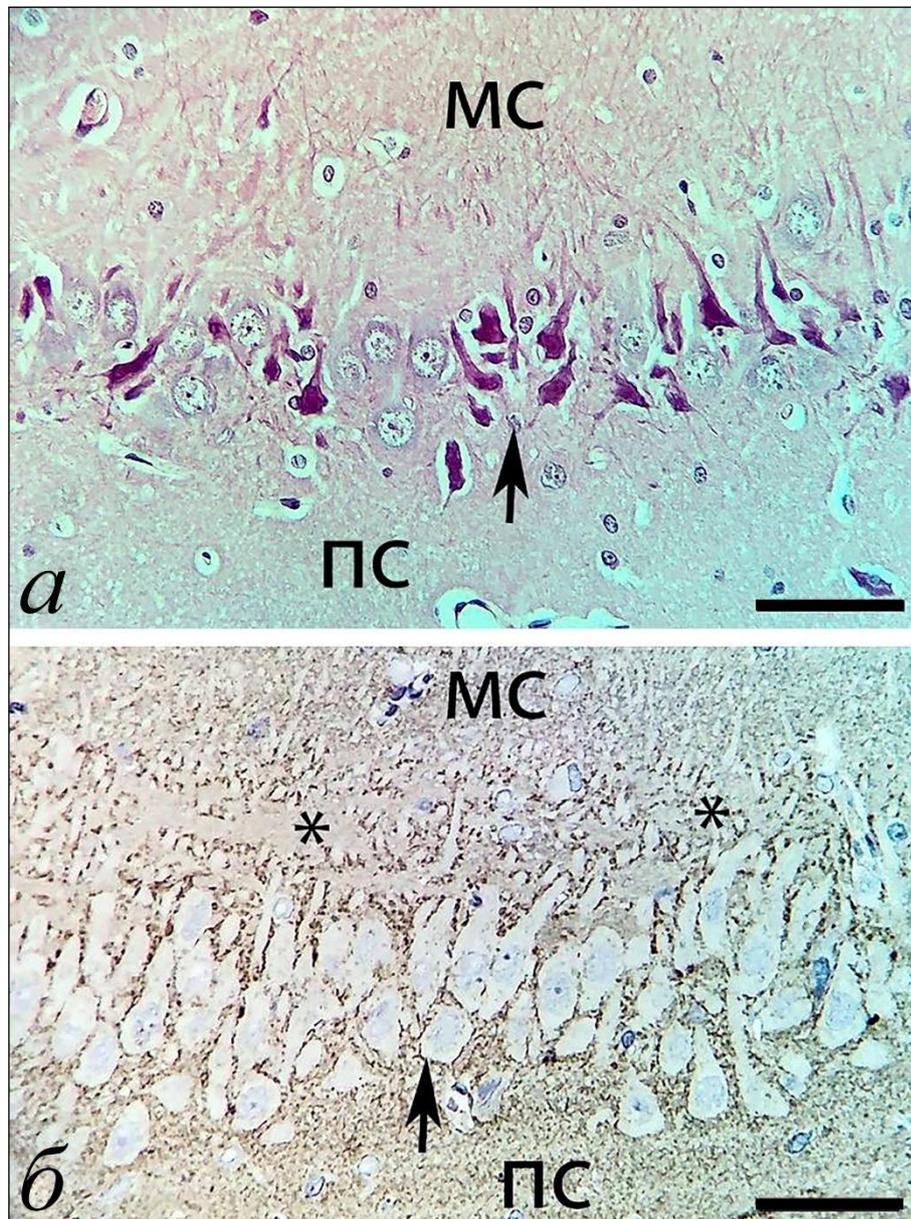
Именно эти синаптические терминали (светлые участки при окраске на

MAP-2) в *stratum radiatum* CA₁ и особенно гигантские терминалы в *stratum lucidum* CA₃ интенсивно окрашивались при иммуногистохимическом выявлении синаптофизина (см. Рисунок 13а, б). В *stratum radiatum* CA₁ крупные терминалы практически не выявлялись. Локализация меток была вдоль дендритов и в нейропиле (см. Рисунок 13а). В *stratum lucidum* CA₃ метки локализовались вдоль апикальных дендритов (см. Рисунок 13б). Это позволяло их легко идентифицировать, измерять численную плотность, абсолютную и относительную площадь/объем.

По данным иммуногистохимического исследования, после 20 мин ООСА в поле CA₃ уменьшалась плотность распределения *p38*-позитивных (синаптофизин) гигантских терминалов (Рисунок 14б) и появлялось большое количество пирамидных нейронов с признаками конденсации и фрагментации цитоскелета в перикарионе и дендритах при реакции на *MAP-2* (см. Рисунки 14 и 15).

Деструкция цитоскелета в основном была характерна для нейронов с дегидратацией и сморщиванием, что, вероятно, свидетельствовало о сопровождающих эти изменения конформационных перестройках белков цитоскелета. Максимальная степень конденсации *MAP-2*-позитивного материала дендритов отмечена в сморщенных гиперхромных нейронах через 1, 3 и 7 сут (см. Рисунки 14 и 15). Через 1 сут появление темных нейронов сочеталось с явными проявлениями отека-набухания (см. Рисунок 13а).

Доля темных апикальных дендритов относительно единицы длины пересекающей их под прямым углом прямой линии после 20 мин ООСА: 58,4–71,5,2 % (95 % ДИ, $p = 0,01$). Через 14 сут после 20 мин ООСА доля клеток с выраженной конденсацией микротрубочек цитоскелета перикарионов и дендритов уменьшалась до 15,8–24,5 % (95 % ДИ), но все равно была выше, чем в контроле (критерий $\chi^2 = 8,5$; $p = 0,01$). Вполне вероятно, что это свидетельствовало о восстановлении цитоматрикса несморщенных и удалении части пикноморфных нейронов.



Примечание: Стрелки – слой пирамидных нейронов, * – stratum lucidum, МС – молекулярный слой, ПС – полиморфный слой. Окраска: гематоксилин-эозином (а), иммуногистохимическая реакция на р38 (в), объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм.

Рисунок 15 – Фрагменты поля СА₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а, б) сут после 20 мин ООСА: а – проявления гидропической дистрофии (отек-набухание нейрона, астроцитов, нейронов), высокая плотность астроцитов, уменьшение доли нормохромных нейронов; б – уменьшение количества гигантских терминалей в stratum lucidum

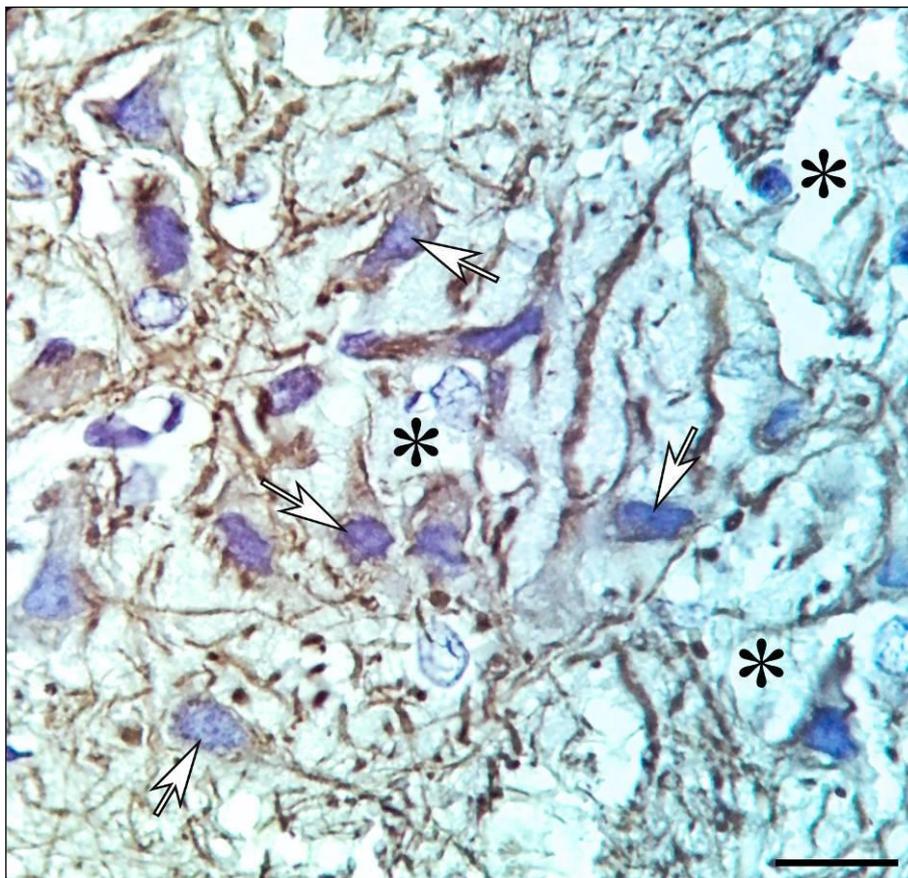


Рисунок 16 – Поле CA₃ гиппокампа белой крысы через 1 сут после 20 мин ООСА: проявления отека-набухания (*) слоя пирамидных нейронов (стрелки) и stratum lucidum. Стрелки – темные (сморщенные) пирамидные нейроны. Окраска: иммуногистохимия, типирование MAP-2. Докраска гематоксилином, объектив × 100, шкала – 20 мкм

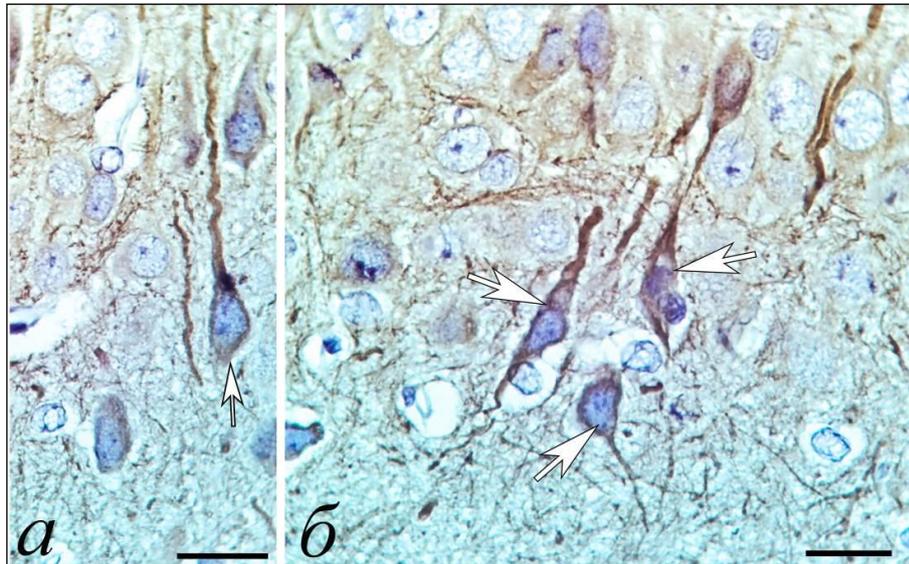


Рисунок 17 – Фрагменты поля CA₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а), 3 (б) сут после 20 мин ООСА: увеличение доли гиперхромных сморщенных нейронов (стрелки) с выраженной конденсацией цитоматрикса по периферии перикариона и дендритах. Окраска: иммуногистохимия, типирование MAP-2, объектив × 100, шкала – 20 мкм

Деструктивные и репаративные изменения пирамидных нейронов, их дендритов и астроцитов поля CA₃ гиппокампа после 20 мин ООСА сопровождались статистически значимыми изменениями численной плотности и относительной площади крупных и гигантских терминалей в *stratum lucidum* (Рисунки 13а, б и 16) Эти терминали надежно верифицировались с помощью иммуногистохимической реакции на синаптофизин (*p38*) синаптических пузырьков, а их большие размеры позволяли точно оценить динамику изменения количества и площади терминалей в посттравматическом периоде.

В остром периоде после 20 мин ООСА появлялись очаги с низкой и высокой плотностью частиц *p38*-позитивного материала (см. Рисунок 16а, б, в). Низкая плотность соответствовала зонам CA₃ с высоким содержанием гиперхромных нейронов (см. Рисунок 13а) и выраженным проявлениям отека-набухания нервной ткани, а высокая плотность – зонам с преобладанием нормохромных нейронов.

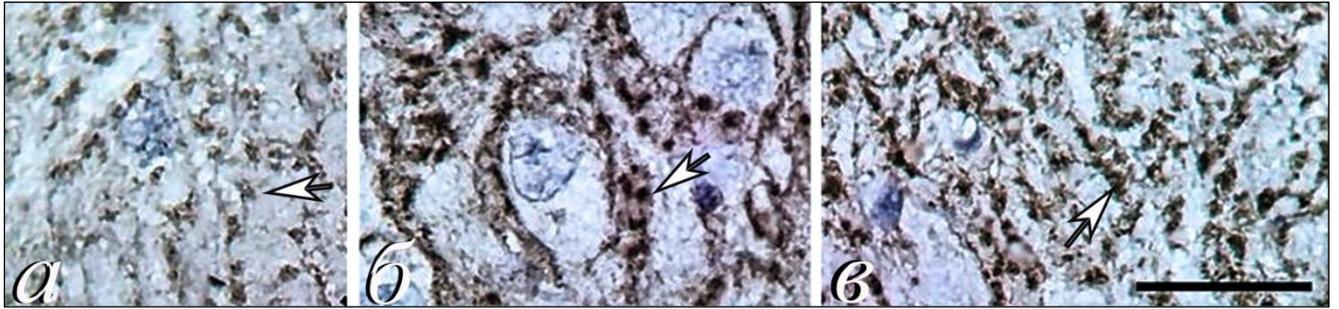


Рисунок 18 – Фрагменты *stratum lucidum* поля CA₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а), 3 (б) и 7 (в) сут после 20 мин ООСА: через 1 сут (а) отмечалось явное уменьшение плотности и яркости окраски p38-позитивных структур, фрагментация синаптических терминалей; через 3 сут (б) появлялось большое количество крупных интенсивно окрашенных синаптических терминалей вокруг тел и отростков пирамидных нейронов (стрелки); через 7 (в) сут восстанавливалось распределение и интенсивность окраски терминалей до контрольного вида. Окраска: иммуногистохимия, типирование p38, объектив × 100, шкала – 25 мкм

Морфометрическая оценка синаптических терминалей проводилась по количеству и площади меток p38. Через 1 сут после 20 мин ООСА происходило смещение в сторону увеличения доли полей зрения с низкой площадью меток. Это свидетельствовало о разрушении части синаптических терминалей и содержащегося в них p38 (Рисунок 19а, б).

Однако уже через 3 сут после 20 мин ООСА было отмечено компенсаторное увеличение общей численной плотности и площади меченых (p38) терминалей (см. Рисунок 19а). Далее показатели численной плотности терминалей были стабильными (см. Рисунок 17).

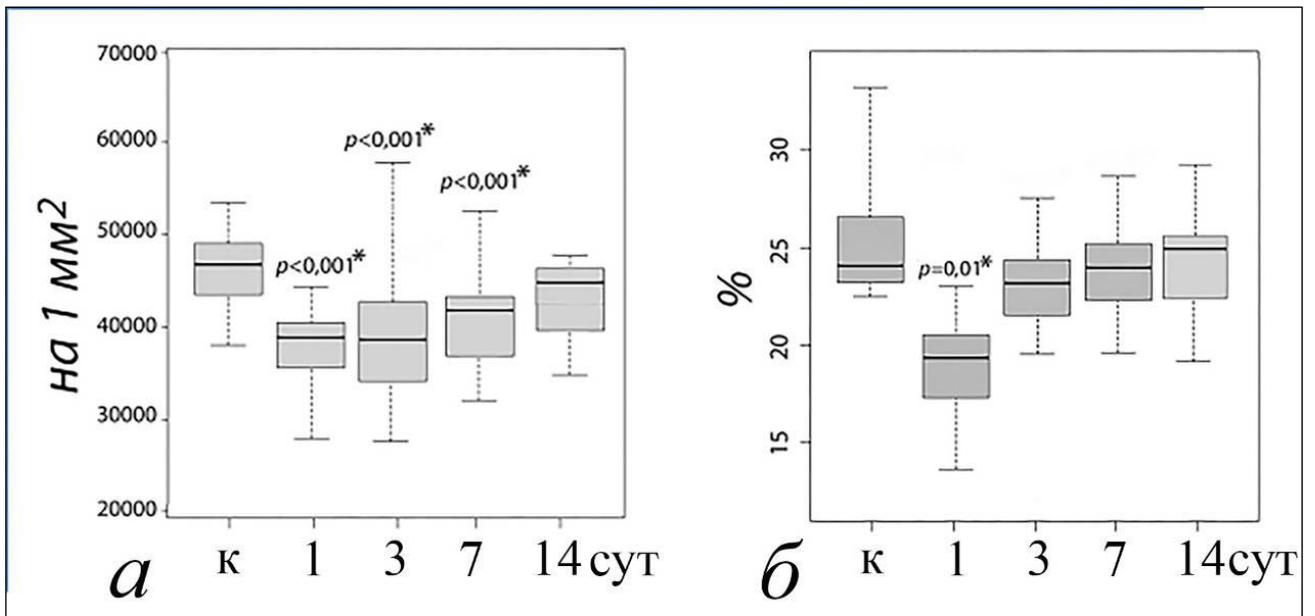
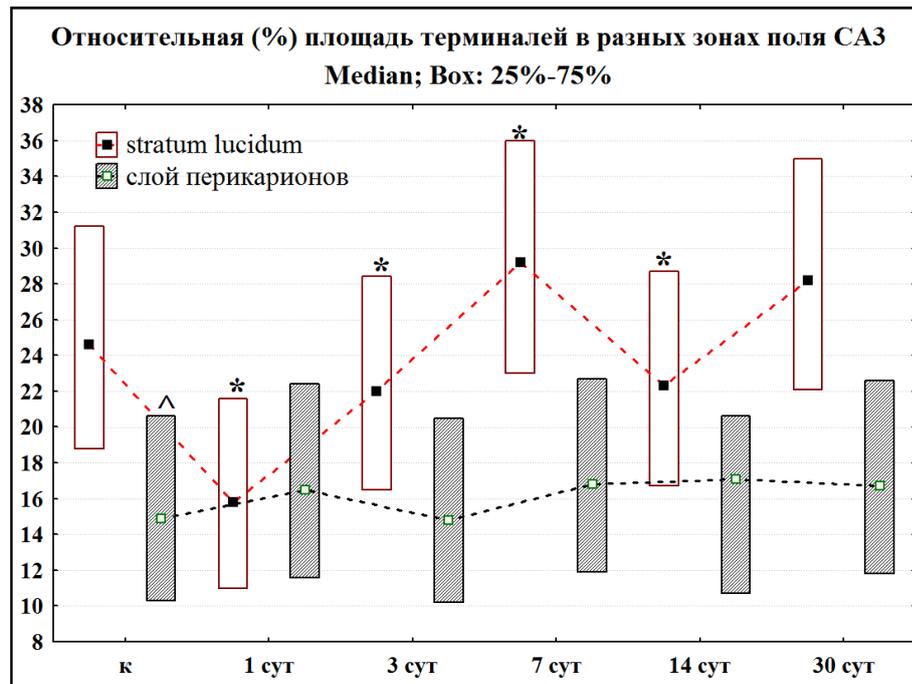


Рисунок 19 – Общая численная плотность (а) и относительная площадь (б) гигантских терминалей в поле CA_3 после 20 мин ООСА: через 1 сут происходит разрушение части синапсов с уменьшением плотности и общей площади их терминалей. Материал представлен как медиана (50 %), 25–75 % квантили (бокс), диапазон без выбросов (Min-Max)

Необходимо отметить, что относительная площадь $p38$ -позитивных частиц уменьшалась только в зоне апикальных дендритов (аксодендритические синапсы *stratum lucidum*) поля CA_3 , а в зоне скопления тел пирамидных нейронов CA_3 (аксосоматические синапсы) этот показатель не менялся (см. Рисунок 18).



Примечание: * – различия статистически значимы в сравнении с контролем,

^ – с предыдущим сроком (при $p = 0,001$; критерий Манна – Уитни). При множественном сравнении по срокам (ANOVA Краскела – Уоллиса) удалось отвергнуть нулевую гипотезу для *stratum lucidum* ($df = 5$; $N = 34,5$; $p = 0,0001$).

Рисунок 20 – Относительная площадь (%) частиц *p38*-позитивного материала в зоне дендритов (*stratum lucidum*) и тел пирамидных нейронов поля СА₃ гиппокампа белых крыс в норме и после 20 мин ООСА, иммуногистохимическое типирование *p38*

Таким образом, реорганизация межнейронных отношений в СА₃ гиппокампа после 20 мин ООСА – длительный процесс, сочетающий в себе деструкцию, восстановление или/и образование новых синапсов. Реорганизация синапсов происходила на фоне очагового отека-набухания нервной ткани, очаговых дистрофических, некробиотических и компенсаторно-восстановительных изменений популяции пирамидных нейронов. Вполне вероятно, что гетерохронность и очаговость изменения количества межнейронных синапсов обусловлена изначальным полиморфизмом пирамидных нейронов СА₃- особенностями их реакции, чувствительности, устойчивости и пластичности. Однако, при использовании модели 20 мин ООСА больших

перепадов значений общей численной плотности и относительной площади меченных *p38* терминалей не было выявлено (Рисунок 17а, б и 18).

Следовательно, нами установлено, что в остром периоде (1 и 3 сут) после 20 мин ООСА в гиппокампе увеличивалась степень гидратации нервной ткани, изменялись тинкториальные свойства нейронов, разрушались дендриты (их цитоскелет) и синаптические терминалы. Изменения были мелкоочаговыми (мозаичными), имели гетерохронный и гетероморфный характер, преобладали через 1 и 3 сут. Несомненно, что при наличии подобных реактивных и патологических изменений после 20 мин ООСА неизбежно блокировалась передача импульсов и нарушалась межнейронная коммуникация энторинальной коры, гиппокампа и зубчатой извилины. После частичного разрушения терминалей активировались компенсаторно-восстановительные процессы за счет синаптической пластичности и постоянной реорганизации сохранившихся нейронных сетей. Мы полагаем, что одновременно реализовалась пластичность Геббеса и гомеостатическая пластичность – образование и гибель синапсов. Эта закономерность восстановления функций нервной ткани описана ранее и связана с перманентной подстройкой «информационной матрицы» к условиям функционирования [133]. Вероятно, что функциональное восстановление гиппокампа после 20 мин ООСА происходило быстро за счет реорганизации связей устойчивых к ишемии нейронов и сопровождалось образованием новых терминалей. При этом восстановление межнейронных отношений сохранившихся нейронов и их компенсаторная реорганизация происходили путем гипертрофии и образование избыточного количества синаптических терминалей с последующей их частичной элиминацией. Причинно-следственные временные сопоставления позволили считать, что в процессе восстановления межнейронных коммуникаций уменьшались проявления отека-набухания, восстанавливался цитоскелет нейронов, усиливались проявления реактивного астроглиоза, увеличивалась доля нейронов с двумя и более ядрышками. Все это рассматривается как условия, обеспечивающие реализацию механизмов защиты, адаптации, возможности активации нервных клеток и перестройки нейронных сетей под конкретное функционирование нейронных сетей.

Для более детальной характеристики структурных механизмов восстановления функционирования нейронных сетей гиппокампа, определения роли плеiotропных каспаз и участия в этом процессе нейроглии нами проведено соответствующее иммуногистохимическое исследование.

3.4 Иммуногистохимическое исследование роли плеiotропных белков апоптоза в нейропластической реорганизации межнейронной коммуникации нейронов гиппокампа

Ранее нами [42] установлено, что при типировании *p38* локализация его меток соответствовала таковой для каспазы-3 (см. Рисунок 17а, б). При этом в телах неповрежденных пирамидных нейронов каспаза-3 не выявлялась, она локализовалась только в терминалях аксодендритических, аксошипиковых и аксосоматических синапсов (см. Рисунок 19а, б).

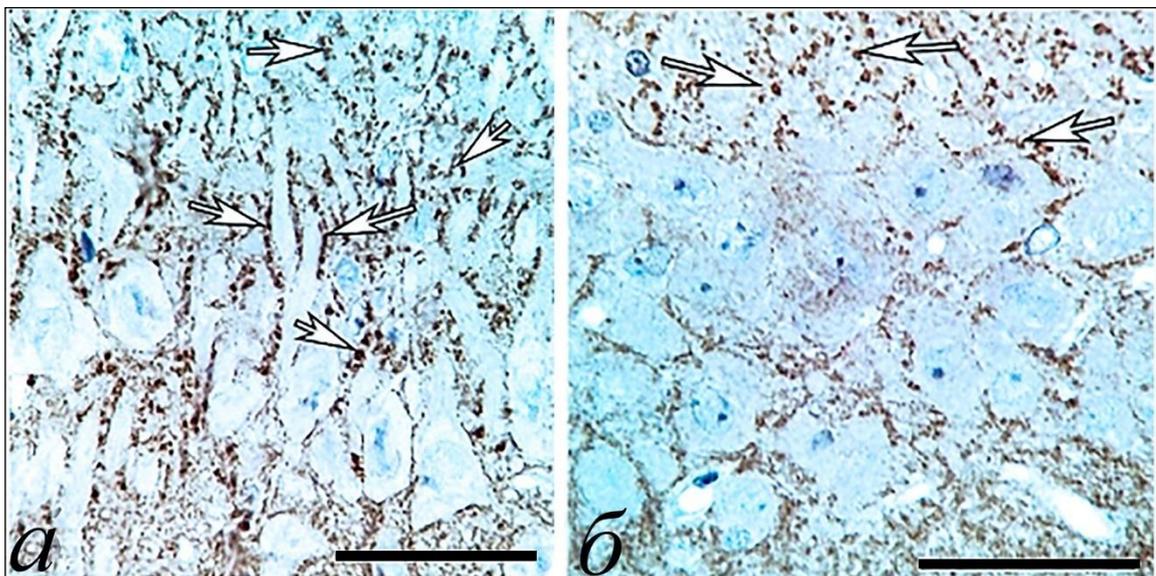


Рисунок 21 – Поле CA₃ гиппокампа контрольных белых крыс: наличие гигантских терминалей в *stratum lucidum* (стрелки) при иммуногистохимической окраске против синаптофизина (а) и каспазы-3 (б). Докраска гематоксилином, объектив × 100, шкала – 25 мкм

Таким образом, по своей локализации каспаза-3 в поле CA₃ соответствовала стратегическим зонам реализации механизмов синаптической пластичности. При этом большее ее количество было в терминалях аксошипиковых и аксодендритических синапсов. Это позволило предположить, что данный плейотропный фермент апоптоза может принимать участие в механизмах защиты, компенсации и восстановления межнейронных связей гиппокампа как в норме, так и после ишемического воздействия. При этом острая ишемия головного мозга, вероятно, стимулировала свойства каспазы-3, связанные не с конечной фазой апоптоза, а с механизмами нейропластичности. Вероятно, каспаза-3, как специфический протеолитический фермент, участвовала в ремоделировании межнейронных синапсов, обеспечивая более высокую подвижность синаптических терминалей в пространстве нейропиля.

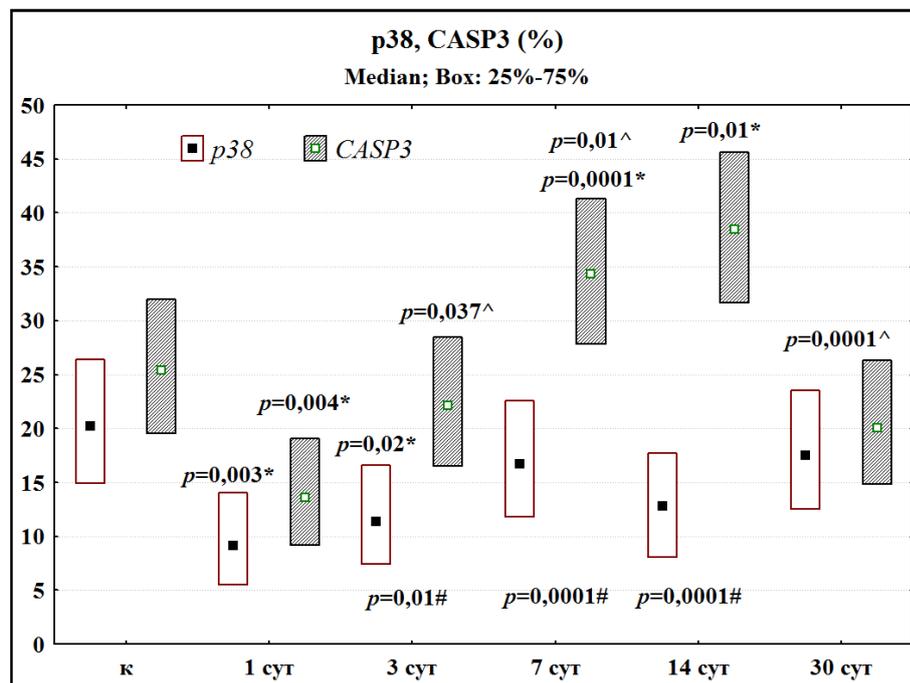
Для проверки этой гипотезы мы сравнивали площадь меток при иммуногистохимическом выявлении *p38* и каспазы-3 в терминалях. Изучение апоптоза сводилось к определению активности про- (*p53*), антиапоптозных (*bcl-2*) белков и каспазы-3 в перикарионе нейронов.

Ранее в настоящей работе указано, что реорганизация межнейронных отношений, лежащая в основе нейропластичности, после 20 мин ООСА в гиппокампе происходила на фоне появления темных нейронов, умеренных проявлений отека набухания нейропиля и умеренного уменьшения общей численной плотности пирамидных нейронов.

Существенно то, что через 1 сут после 20 мин ООСА белки регуляции апоптоза (*p53*, *bcl-2*) выявлялись в единичных нейронах. Каспаза-3 имела высокую активность только в синаптических терминалях, а в перикарионах данный белок, как и в контроле, не отмечен. Мы полагаем, что при 20 мин ООСА не происходило выраженной гибели нейронов, поэтому элиминация нейронов путем апоптоза, как механизм удаления необратимо измененных нейронов, не был задействован. Единичные нейроны с признаками активации белков регуляции апоптоза без наличия активной каспазы-3 в цитоплазме сомы нейронов свидетельствовали только о принципиальной возможности реализации данного процесса. Активировались преимущественно защитные и компенсаторные

механизмы, обеспечивающие не разрушение, а сохранение поврежденных нейронов. В результате большая часть дистрофически и дегенеративно измененных нейронов CA₃ восстанавливалась до полнофункциональных нормохромных нейронов. Поэтому каспаза-3 целесообразно рассматривать в аспекте ее плеiotропности – участия в адапционных и восстановительных процессах за счет постишемической активации нейропластичности (на уровне аксонов и синапсов) [42]. Возможность подобного феномена доказана другими авторами. Недавние исследования показали, что клетки могут переживать даже кратковременную активацию каспазы-3 в перикарионе после апоптотических стимулов, этот процесс назван анастазированием (анастаз) [17; 62; 105; 239].

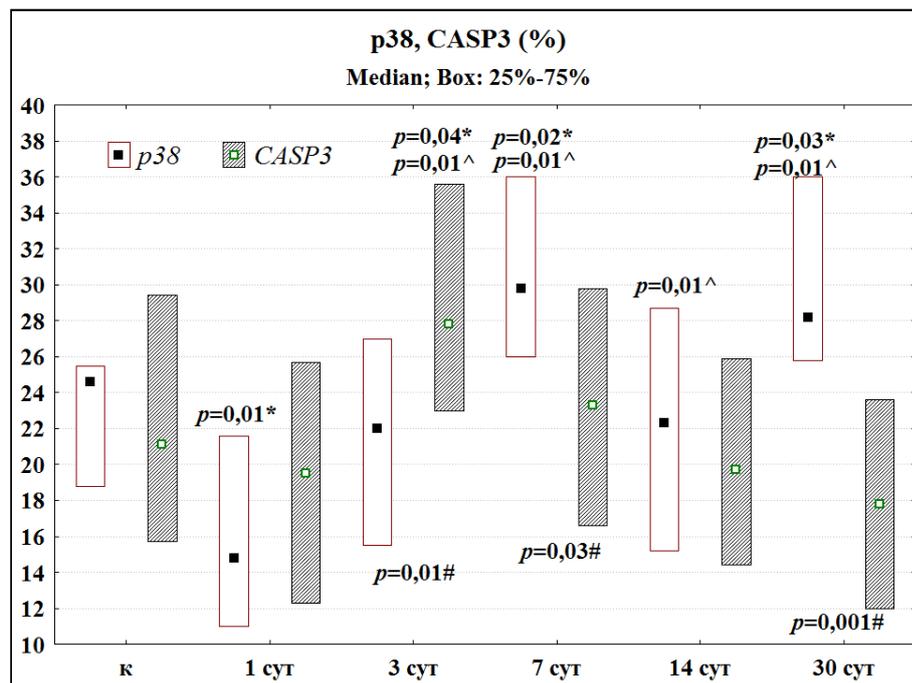
Нами установлено, что в поле CA₁ количество меченного синаптофизина снижалось через 1 и 3 сут. Затем этот показатель восстанавливался до контрольного уровня (Рисунок 20).



Примечания: Различия статистически значимы в сравнение с контролем (*), с предыдущим сроком (^) и между белками (#) при $p < 0,05$ (критерий Манна – Уитни). Данные представлены как Q2 (Q1-Q3) – медиана и интерквартильный размах.

Рисунок 22 – Относительная (%) площадь меток p38 и CASP3 в stratum radiatum поля CA₁ гиппокампа белых крыс в норме и после 20 мин ООСА

В гигантских синапсах *stratum lucidum* поля CA₃ содержание синаптофизина уменьшалось через 1 сут после ишемии, а уже через 3 сут, на фоне высокого содержания каспазы-3 было уже на уровне контроля (Рисунок 21). Все это свидетельствовало о том, что после 20 мин ООСА происходило разрушение p38, связанного с синаптическими пузырьками в синапсах, а затем содержание белка восстанавливалось. Через 7 сут этот показатель статистически значимо превосходил контрольное значение, через 14 сут был на уровне контроля, а затем (30 сут) вновь увеличивался (см. Рисунок 21). Подобная нестабильность, вероятно, свидетельствовала о перманентной реорганизации межнейронных отношений путем чередования пластичности Геббеса и гомеостатической пластичности. После образования новых синапсов в нейронных сетях использовались только активные синапсы, а остальные элиминировались с помощью глиоцитов.



Примечания: Различия статистически значимы в сравнение с контролем (*), с предыдущим сроком (^) и между белками (#) при $p < 0,05$ (критерий Манна – Уитни). Данные представлены как Q_2 (Q_1 - Q_3) – медиана и интерквартильный размах.

Рисунок 23 – Относительная (%) площадь меток p38 и CASP3 в *stratum lucidum* поля CA₃ гиппокампа белых крыс в норме и после 20 мин ООСА

В норме относительная площадь меток каспазы-3 в поле CA₁ и CA₃ статистически значимо не отличалась от таковой синаптофизина (Рисунки 20 и 21). В постишемическом периоде наиболее выраженные изменения содержания каспазы-3 отмечались в *stratum radiatum* поля CA₁. Здесь содержание каспазы-3 в остром периоде по сравнению с контролем сначала (1 сут) уменьшалось в 1,8 раза, через 3 сут восстанавливалось до контрольного уровня, а затем (через 7 и 14 сут) его превышало. При этом через 3, 7 и 14 сут относительная площадь меток каспазы-3 была больше, чем площадь меток p38 (см. Рисунок 20). В *stratum lucidum* поля CA₃, содержащем большое количество гигантских терминалей, статистически значимого превышения площади терминалей по меткам каспазы-3 над p38 выявить не удалось (см. Рисунок 21).

Полученные данные свидетельствовали о существовании какой-то связи каспазы-3 и p38 в процессе изменения межнейронных взаимоотношений на уровне поля CA₁ и, в меньшей степени, CA₃ гиппокампа.

После 20 мин ООСА в гиппокампа были отмечены не только очаговые изменения плотности p38-, но и MAP-2-позитивного материала, свидетельствующие о выраженной конденсации цитоскелета, разрушении и дегидратации его белков. Подобные структурные изменения неизбежно приводили к нарушению функций цитоскелета части нейронов и, наряду с деструкцией p38, блокировали передачу импульсов по их отросткам. Найденные изменения цитоскелета в той или иной степени сохранялись на протяжении всего изученного временного периода, но в большей степени проявлялись через 1–3 сут. Именно в это время после 20 мин ООСА отмечены максимальные проявления отека-набухания и наибольшее содержание дистрофически измененных темных нейронов. Далее (7 и 14 сут) происходило восстановление цитоскелета основной массы темных нейронов, а цитоскелет необратимо измененных сморщенных нейронов, вероятно, разрушался в течение длительного времени посредством фагоцитоза астроцитами и микроглиоцитами. Пикноморфные нейроны и связанные с ними изменения дендритов наблюдали на протяжении 30 сут после 20 мин ООСА. Вполне вероятно, что в утилизации таких нейронов, лишенных

ферментов лизосомальной системы, могли принимать участие апоптозные протеолитические каспазы из разрушенных терминалей асксосоматических синапсов по механизмам отличным от апоптоза. Множественное действие некоторых белков, включая и каспазу-3, требует дальнейшего изучения в рамках развития концепции естественной постишемической защиты нейронов.

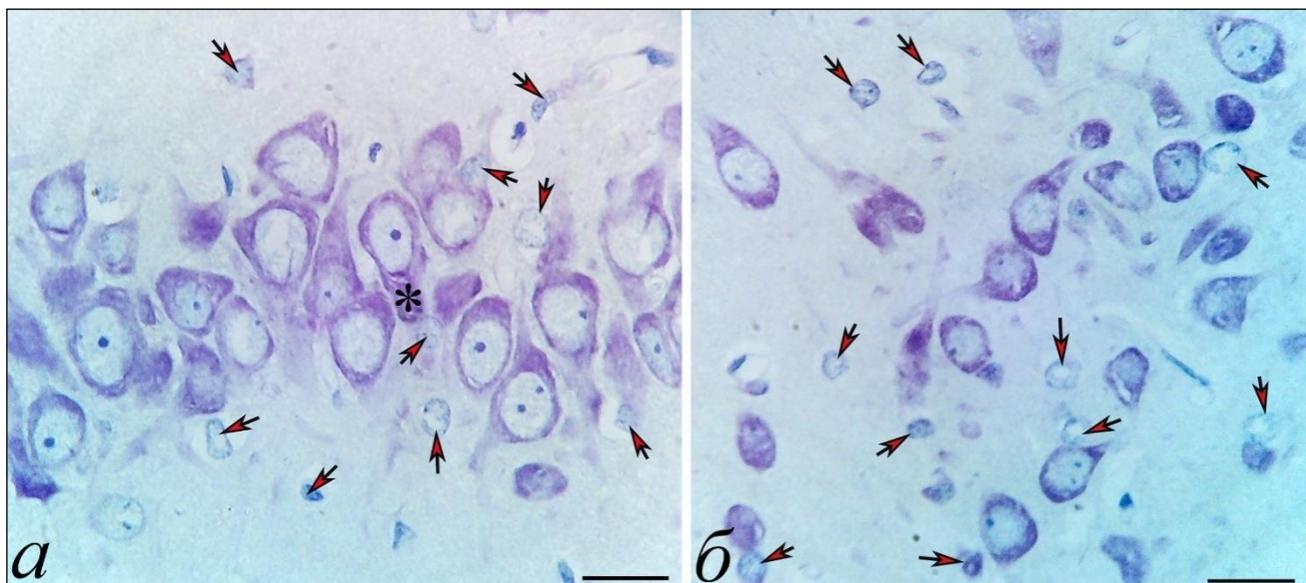
Резюме. При изучении нейронов и систем межнейронной коммуникации (дендриты, терминали) гиппокампа после 20 мин ООСА выявлены умеренные диффузно-очаговые изменения: увеличивалась степень гидратации нервной ткани, активировались обратимые дистрофические и некробиотические процессы, уменьшалась численная плотность нейронов, разрушались и восстанавливались дендриты и синапсов. То есть, на фоне необратимого повреждения части нейронов происходило усиление белок-синтетической функции, восстановление конформационного состояния белков цитоскелета поврежденных нейронов, активировались процессы синаптической пластичности. Выявленные структурные изменения имели гетерохронный и гетероморфный характер – отличались в CA₁, CA₃, CA₄ и зубчатой извилины. Восстановление межнейронных отношений в гиппокампе происходило на фоне избыточного образования новых синаптических терминалей. В совокупности найденные изменения необходимо рассматривать как основу для длительной перманентной компенсаторно-восстановительной реорганизации нейронных сетей гиппокампа после острой транзиторной ишемии головного мозга. Полученные данные можно использовать при изучении феномена полиморфизма, селективного повреждения и восстановления нейронов гиппокампа после незначительного/умеренного диффузно-очагового повреждения нервной ткани. Любые, даже незначительные необратимые повреждения нейронов неизбежно приводят к существенной реорганизации нейронных сетей гиппокампа. Функция погибших нейронов замещается перестройкой сохранившихся нейронов.

3.5 Гистологическая и иммуногистохимическая характеристика нейроглиоцитов

По литературным данным, в зрелом мозге млекопитающих формируются сложные частично автономные структурно-функциональные системы (клеток, базальных мембран и межклеточного пространства) со специфическими и неспецифическими внутренними локальными связями – *нейро-глиососудистые микроструктурные комплексы*. В эти комплексы входят несколько типов клеток: нейроны, глиальные клетки, перициты и эндотелиоциты [5; 11; 26; 36; 38; 83; 199].

3.5.1 Поля CA₁ и CA₃

Поэтому постишемическая реорганизация цитоархитектоники и межнейронных отношений закономерно происходила с участием всех типов глиальных клеток – астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов. Прежде всего, это проявлялось изменением нейроглиальных отношений по их численной плотности. Выявлено статистически значимое увеличение нейроглиального индекса (НГИ), то есть один нейрон получал большую «помощь», чем в контроле (Рисунок 22, Таблица 6).



Примечание: * – слой пирамидных нейронов. Окраска по Нислю, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм.

Рисунок 24 – Фрагменты поля СА₃ и СА₄ гиппокампа через 3 сут после 20 мин ООСА: большое количество астроцитов (стрелки)

Таблица 6 – Нейроглиальные отношения (НГИ) в гиппокампе белых крыс в норме и после ООСА, Q2 (Q-Q3), окраска по Нислю

Показатель	Гиппокамп в целом
Контроль	0,5 (0,2–0,7)
1 сут	0,6 (0,3–0,8)
3 сут	1,1 (0,7–1,2) ^{^*}
7 сут	1,4 (0,9–1,5) ^{^*}
14 сут	1,2 (0,8–1,3) ^{^*}
30 сут	0,8 (0,4–1,1) ^{^*}
ANOVA (df = 5)	H = 22,5; p = 0,001

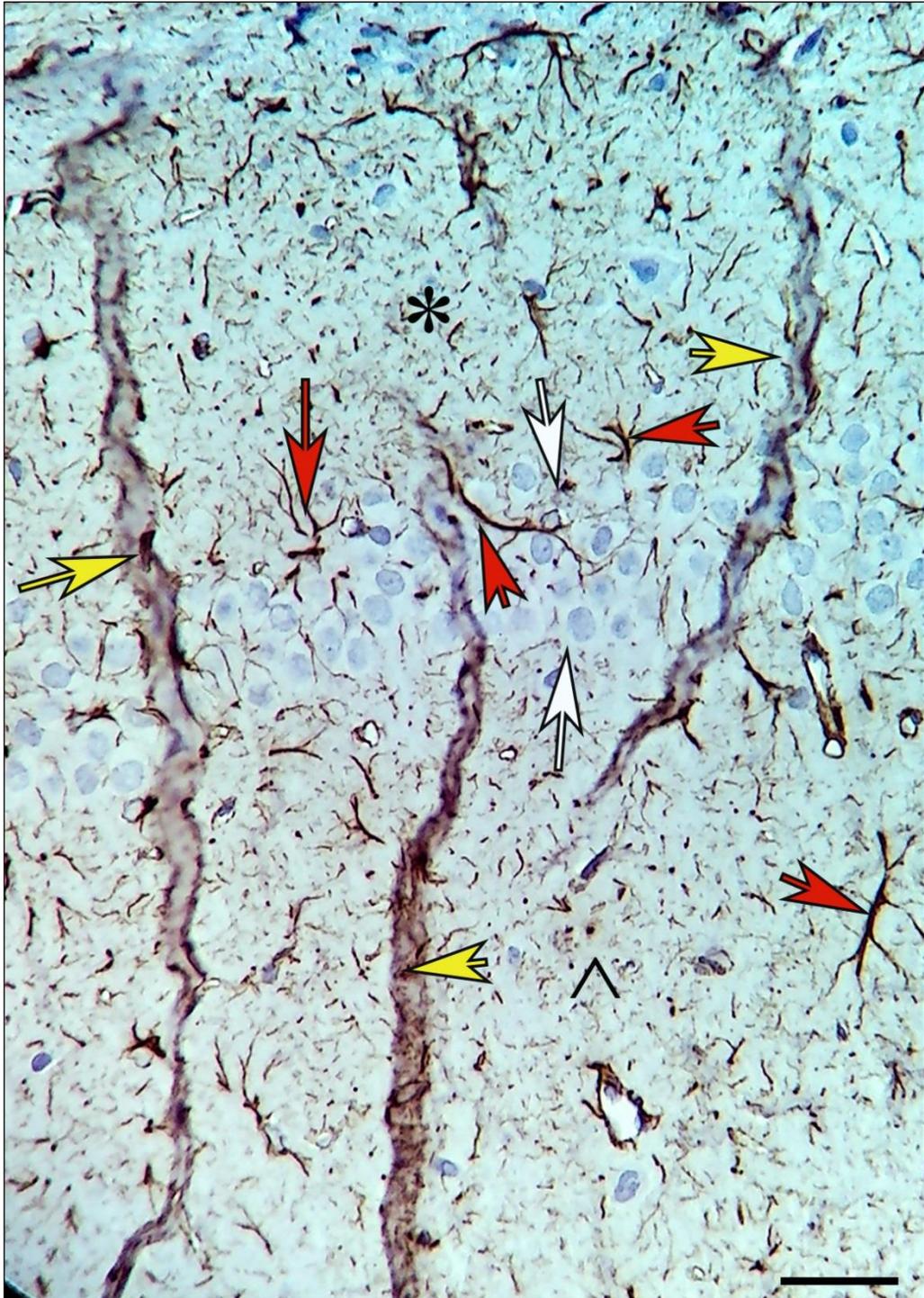
Примечания: * Различия в сравнении с контролем, ^ – предыдущим сроком статистически значимы при $p = 0,01$ (критерий Манна – Уитни).

ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса. Нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$. Материал представлен как медиана (Q2), нижний (Q1) и верхний (Q3) квартили.

При иммуногистохимическом исследовании фронтальных срезов гиппокампа выявлено неоднородное распределение *GFAP*-позитивного материала: больше вокруг сосудов, затем – полиморфном и молекулярном слоях и меньше – в слое пирамидных нейронов (Рисунок 23).

Волокнистые астроциты имели древовидную организацию, небольшое тело, длинные слаборазветвленные отростки с очень высокой плотностью *GFAP*, локализовались преимущественно в молекулярном и полиморфном слоях (Рисунок 24). Для протоплазматических астроцитов было характерно крупное тело, толстые короткие первичные отростки с неровными контурами, рыхлое заполнение хромогеном, преобладали в слое пирамидных нейронов (см. Рисунок 24 ϵ).

По данным иммуногистохимического изучения распределения *GFAP*, в остром периоде (1–3 сут) после 20 мин ООСА были выявлены структурные признаки отека-набухания и очаговой деструкции части отростков, преимущественно протоплазматических, астроцитов, что сопровождалось, вероятно, разрушением *GFAP* их глиофибрилл (см. Рисунок 24, Таблица 7). Мощные стволы большей части волокнистых астроцитов не имели каких-либо признаков разрушения (фрагментация, истончение) (см. Рисунок 24 a , b).



Примечание: *Белые стрелки* – слой тел пирамидных нейронов поля CA₁, *желтые стрелки* – сосуды, *красные стрелки* – крупные фрагменты астроцитов, * – молекулярные слой, ^ – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимическое типирование *GFAP*, докраска гематоксилином, объектив × 40, шкала – 50 мкм.

Рисунок 25 – Фронтальный срез головного мозга на уровне гиппокампа, контроль:
 послойное распределение структур астроцитов

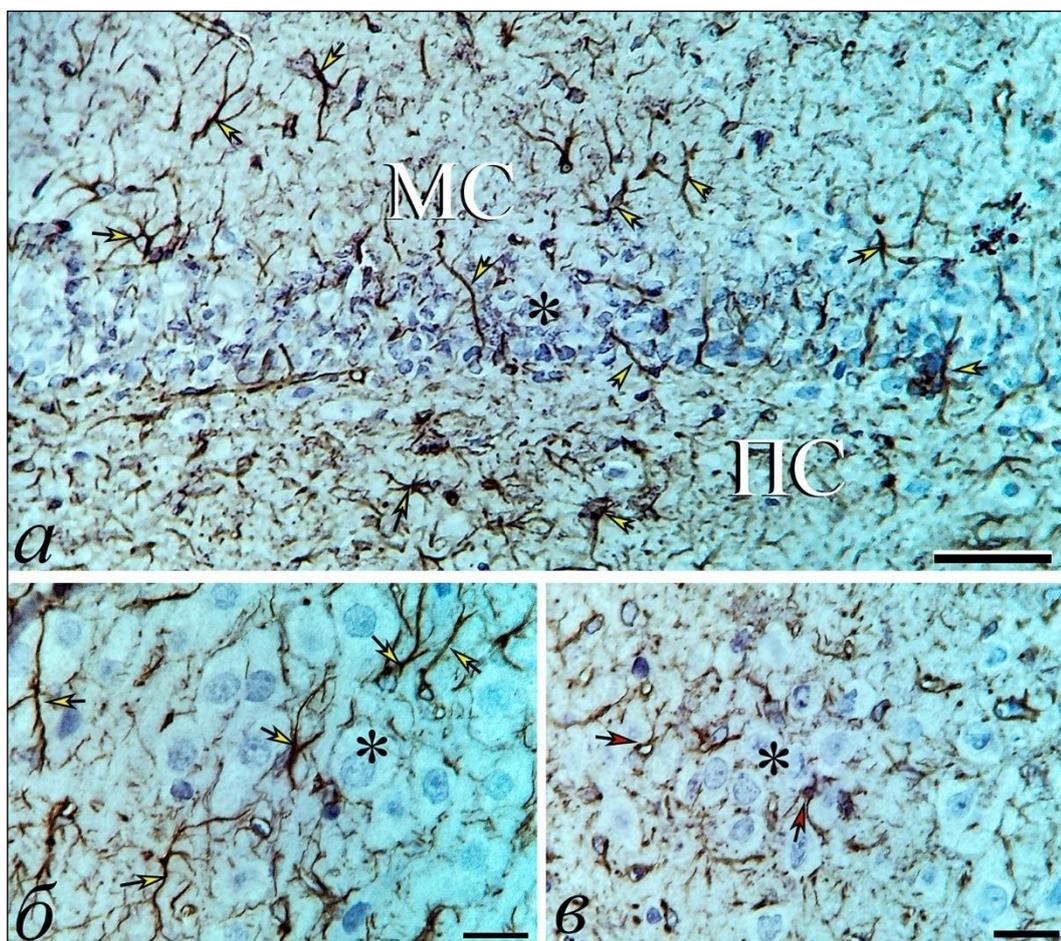


Рисунок 26 – Волокнистые (желтые стрелки) и протоплазматические (красные стрелки) астроциты в различных отделах гиппокампа (через 3 сут после 20 мин ООСА): протоплазматические астроциты преобладают в слое пирамидных нейронов (*), а волокнистые – в молекулярном (МС) и полиморфном (ПС) слоях. Окраска: иммуногистохимическое типирование *GFAP*, докраска гематоксилином, объектив $\times 40$ (а) и $\times 100$ (б, в), шкалы: 50 мкм (а) и 20 мкм (б, в)

Затем, через 7 и 14 сут, на фоне снижения проявлений отека-набухания нервной ткани, отмечались признаки активации популяции астроцитов и олигодендроглиоцитов: пролиферация, гиперплазия (реактивный астроглиоз) и рост отростков, увеличение плотности метки к *GFAP*. По сравнению с контролем, за счет пролиферации, через 3 и 7 сут в 2-3 раза (критерий Манна – Уитни, $p = 0,001$) увеличивалось количество *Ki-67*-позитивных глиоцитов. Таким образом, после 20 мин ООСА в составе нейро-глио-микрососудистых комплексов гиппокампа одни

астроциты атрофировались, а другие подвергались делению и гипертрофировались.

Таблица 7 – Относительный объем/площадь (%) всех типов астроцитов (*GFAP*) в поле CA₃ гиппокампа белых крыс в норме, после ООСА, Q2 (Q1-Q3)

Подгруппы	CA3
Контроль	10,5 (8,0–13,0)
1 сут	13,8 (11,2–16,2) $p = 0,01^*$
3 сут	8,6 (6,2–11,3) $p = 0,001^*$; $p = 0,001^{\wedge}$
7 сут	11,5 (8,9–14,0) $p = 0,001^{\wedge}$
14 сут	9,0 (6,5–11,6) $p = 0,001^{\wedge}$
ANOVA	df = 3; H = 25,4; $p = 0,01$
Примечание: * – парное сравнение с контролем, ^ – сравнение с предыдущим сроком (критерий Манна – Уитни). Различия статистически значимы при $p < 0,05$. При множественном сравнении по срокам нулевая гипотеза отвергнута (ANOVA Краскела – Уоллиса).	

Во всем гиппокампе *GFAP*-позитивный материал выявлялся преимущественно в телах и отростках волокнистых астроцитов (см. Рисунок 14). Эти астроциты имели древовидную организацию: небольшое тело (7–13 мкм), длинные слаборазветвленные отростки с очень высокой плотностью глиофибрилл. Отростки гладкие без выступов. В *stratum lucidum* поля CA₃ вокруг терминалей располагались мелкие отростки астроцитов.

Волокнистые астроциты занимали неперекрывающиеся или слегка перекрывающиеся пространственные области (домены), которые они заполняли толстыми (проксимальными) и тонкими (дистальными) ветвями отростками (см. Рисунок 24). На микрофотографиях видно, что слой тел пирамидных нейронов гиппокампа почти не имел тел астроцитов, тогда как молекулярный и полиморфный слои содержали мало нейронов и много тел астроцитов. В *stratum radiatum* CA₁ волокнистые астроциты имели характерные вытянутые длинные отростки (см. Рисунок 24a).

Для протоплазматических астроцитов было характерно относительно

крупное тело, толстые короткие первичные отростки с неровными контурами, рыхлое заполнение хромогеном. Очень мелкие астроцитарные отростки выглядели в домене как хаотический ажурный рисунок с невысокой оптической плотностью хромогена (см. Рисунок 24в).

Ранее нами [41], по данным классического морфометрического анализа, было установлено что относительная площадь частиц хромогена в единице поля зрения CA_1 в контроле минимальной была в слое пирамидных нейронов, максимальной – в полиморфном слое. *Stratumlacunorum* и *stratumradiatum* молекулярного слоя по этой переменной статистически значимо не различались. При этом плотность нейронной сети, выявленная с помощью реакции на MAP-2, во всех слоях CA_1 была выше, чем плотность глиальной сети примерно в 2-3 раза (критерий Манна – Уитни, $p = 0,001$).

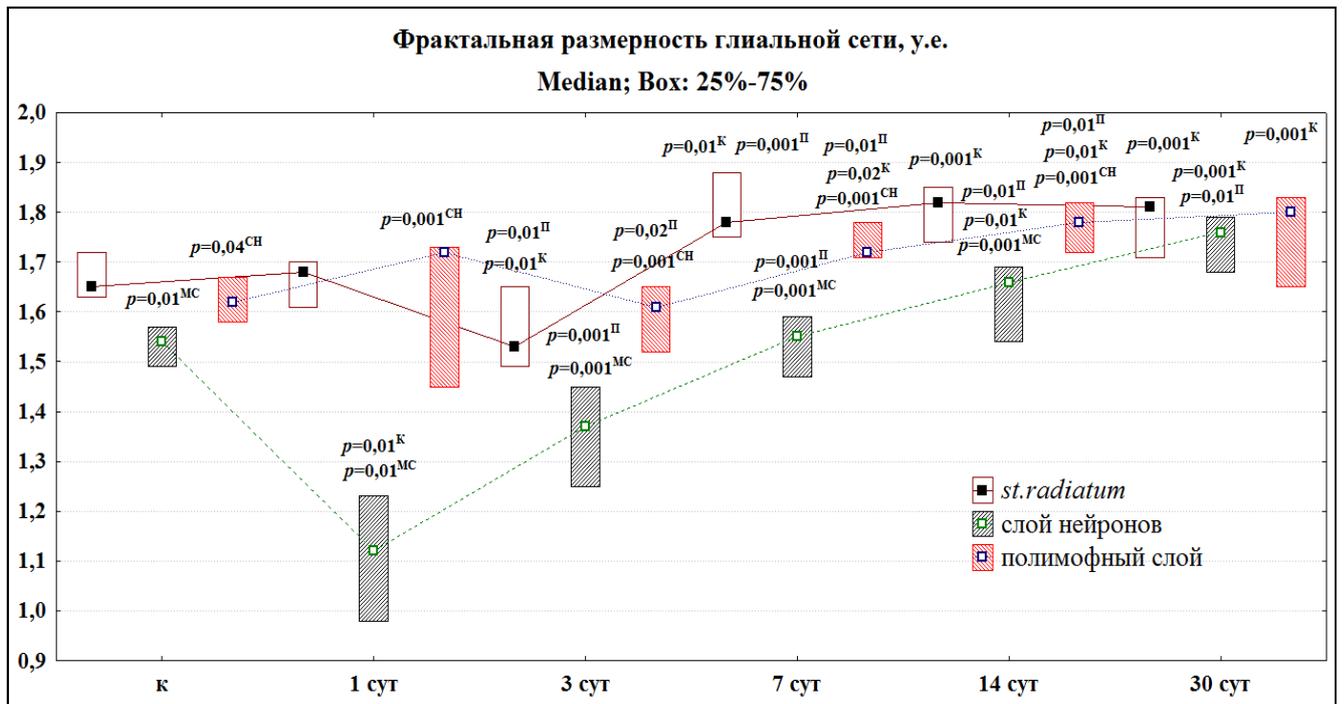
В сравнительном аспекте астроцитов животных группы контроля и постишемического периода, кроме измерения общего содержания, большое значение имели данные о пространственном распределении маркера *GFAP* в отростках астроцитов. Они позволили оценить степень реакции астроцитов на 20 мин ООСА и повреждение окружающих нейронов. Получить подобную информацию мы смогли с помощью фрактального анализа, который позволил количественно оценить сложность формы объектов (астроцитарные отростки) и степень заполненности ими окружающего пространства (слои и поля гиппокампа) [41].

По данным фрактального анализа, в контроле показатели заполнения пространства фрактальными структурами (отростки и тела астроцитов) при иммуногистохимической окраске на *GFAP* в различных слоях гиппокампа статистически значимо различались (Рисунок 25). При этом в молекулярном слое была минимальной мера неоднородности заполнения пространства (лакунарность) фрактальной структурой (Рисунок 26). Все это свидетельствовало о том, что именно в данном слое гиппокампа локализовалась основная масса разнообразных мелких отростков астроцитов.

После 20 мин ООСА глиальные сети гиппокампа подвергались

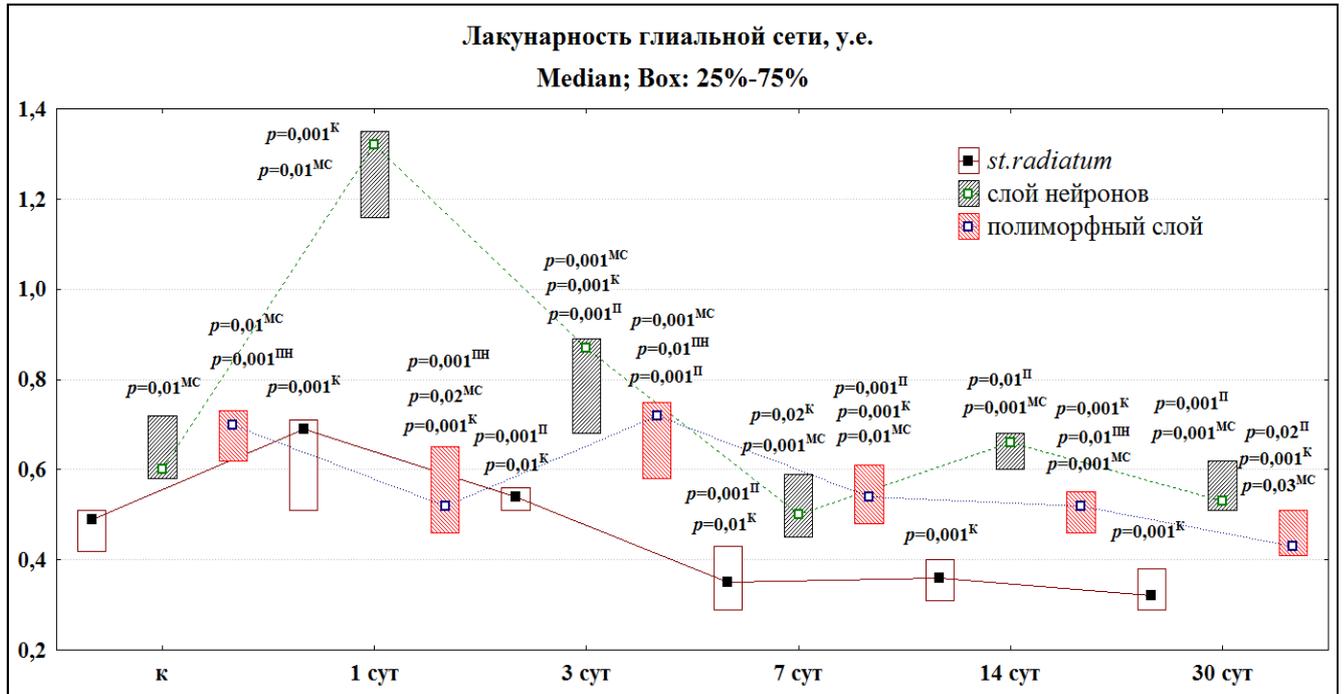
пространственной реорганизации, которая, вероятно, была обусловлена, с одной стороны, отеком-набуханием и деструкцией части отростков астроцитов, а, с другой стороны, пролиферацией и гипертрофией астроцитов в ответ на ишемию. В остром периоде (1 и 3 сут) деструкции и фрагментации подвергались в основном тонкие отростки протоплазматических астроцитов. Затем (7 сут) плотность астроцитарной сети восстанавливалась и даже увеличивалась в молекулярном, полиморфном слоях и внутри слоя пирамидных нейронов. Далее признаки реактивного астроцитоза проявлялись через 7, 14, и через 30 сут во всех слоях гиппокампа, но преобладали в *stratum radiatum*, *stratum lacunorum* молекулярного слоя и полиморфном слое (Рисунок 27).

По данным фрактального анализа, в динамике постишемического периода выявлены статистически значимые изменения всех переменных (фрактальная размерность, лакунарность), характеризующих пространственное распределение астроглиальной сети гиппокампа ($p < 0,05$; Kruskal – Wallis test). Через 1 и 3 сут после 20 мин ООСА, в сравнении с контролем, *FD* уменьшалась, а лакунарность отростков астроцитов увеличивалась (см. Рисунки 25 и 26). Это свидетельствовало о снижении площади *GFAP*-материала и появлении *GFAP*-негативных зон.



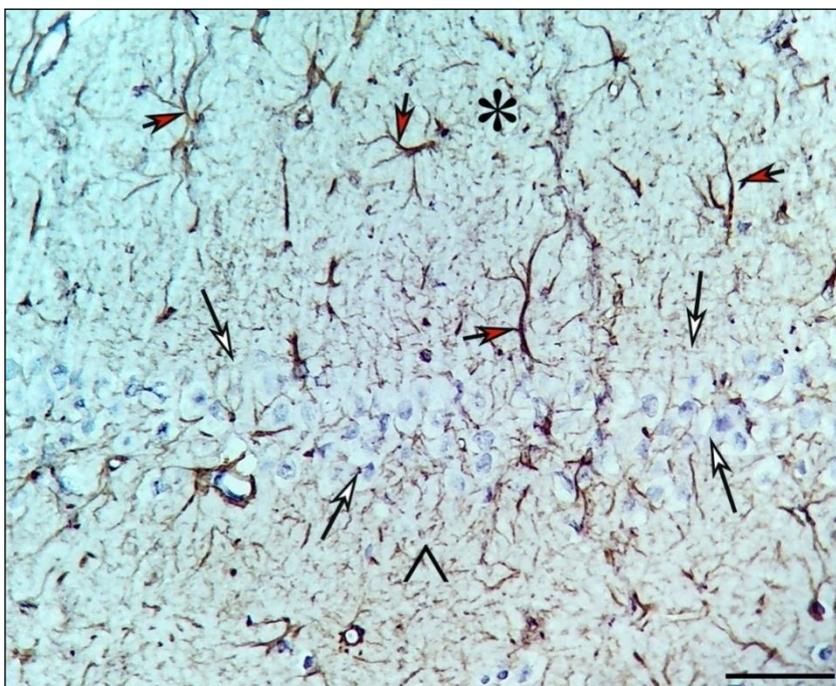
Примечание: ^{MC} – различия статистически значимы в сравнении с молекулярным слоем (*Stratum radiatum*), ^{CH} – слоем пирамидных нейронов (критерий Вилкоксона для зависимых выборок), ^K – контролем, ^{II} – предыдущим сроком (критерий Манна – Уитни). Нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Рисунок 27 – Фрактальная размерность (2D) глиальной сети различных слоев поля CA₁ у животных в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q2)



Примечание: ^{MC} – различия статистически значимы в сравнении с молекулярным слоем (*Stratum radiatum*), ^{CH} – слоем пирамидных нейронов (критерий Вилкоксона для зависимых выборок), ^K – контролем, ^Π – предыдущим сроком (критерий Манна – Уитни). Нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Рисунок 28 – Лакуарность глиальной сети (2D) различных слоев поля CA₁ у животных в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q2)



Примечание: Белые стрелки – слой пирамидных нейронов. Окраска: иммуногистохимическое типирование *GFAP*, докраска гематоксилином, объектив: $\times 40$, шкала – 50 мкм.

Рисунок 29 – Структуры, содержащие *GFAP*-позитивный материал (красные стрелки) в различных отделах поля CA_1 гиппокапа (через 14 сут после 20 мин ООСА): большое количество крупных ветвей волокнистых астроцитов в молекулярном (*) и меньше в полиморфном (^) слоях

Таким образом, по данным фрактального анализа в остром периоде после 20 мин ООСА происходила диффузно-очаговая деструкция и фрагментация части тонких отростков астроцитов. Затем фрактальная размерность увеличивалась, а лакуарность уменьшалась. Это было характерно для всех слоев гиппокампа.

Восстановление глиальной сети сопровождалось постепенным заполнением изученного фрактального пространства отростками астроцитов. Следовательно, с помощью фрактального анализа показано, что после 20 мин ООСА во всех слоях гиппокампа сначала происходила очаговая деструкция, а затем адаптивная пространственная реорганизация астроцитарной сети (астроглиоз), которая, в конечном итоге, вероятно, обеспечивала высокую сохранность нейронной сети.

3.5.2 Зубчатая извилина и поле CA₄

Аналогичные по характеру, но отличные по степени проявления, изменения глияльной сети происходили в зубчатой извилине и, связанным с ней полем CA₄.

В контроле зубчатая извилина характеризовалась очень высокой плотностью распределения нормохромных нейронов (гранулярные клетки) (Рисунок 28а, Таблица 8) и их дендритных отростков, содержащих MAP-2 (см. Рисунок 28б). В CA₄ плотность крупных пирамидных нейронов была значительно меньше, а их тела и расстояния между клетками больше, чем между гранулярными клетками в ЗИ. Однако численная плотность глиоцитов и размеры их тел в ЗИ и CA₄ не различались (см. Таблицу 8). При окраске на MAP-2 относительная площадь хромогена в молекулярном слое ЗИ составила в контроле 42,5 (38,7–44,1) %, а в полиморфном слое – 17,9 (13,4–20,5) %. Относительная площадь MAP-2 в молекулярном слое поля CA₄ составила 38,5 (29,8–46,5) %.

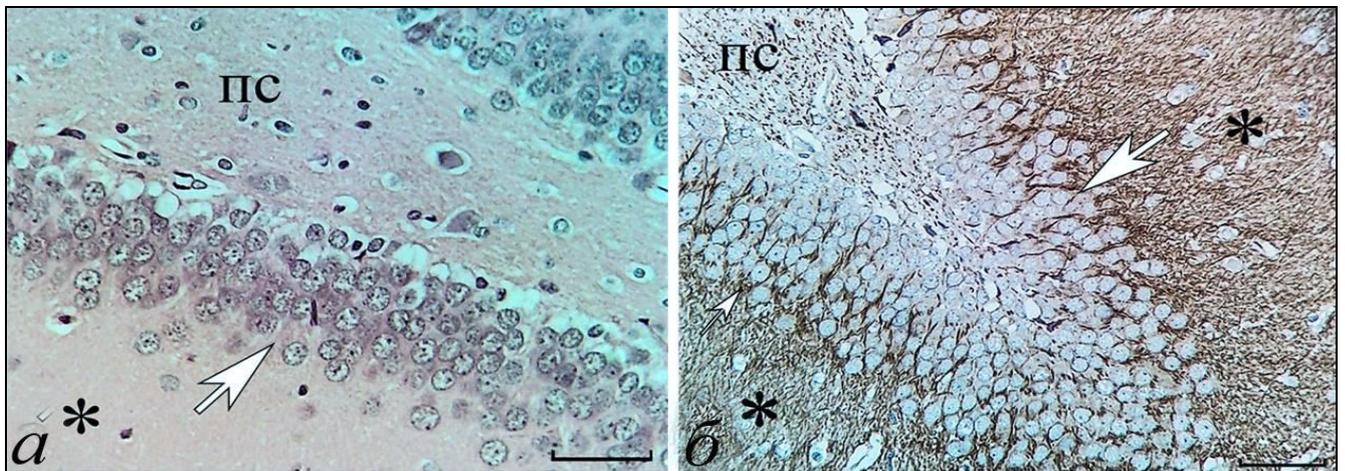
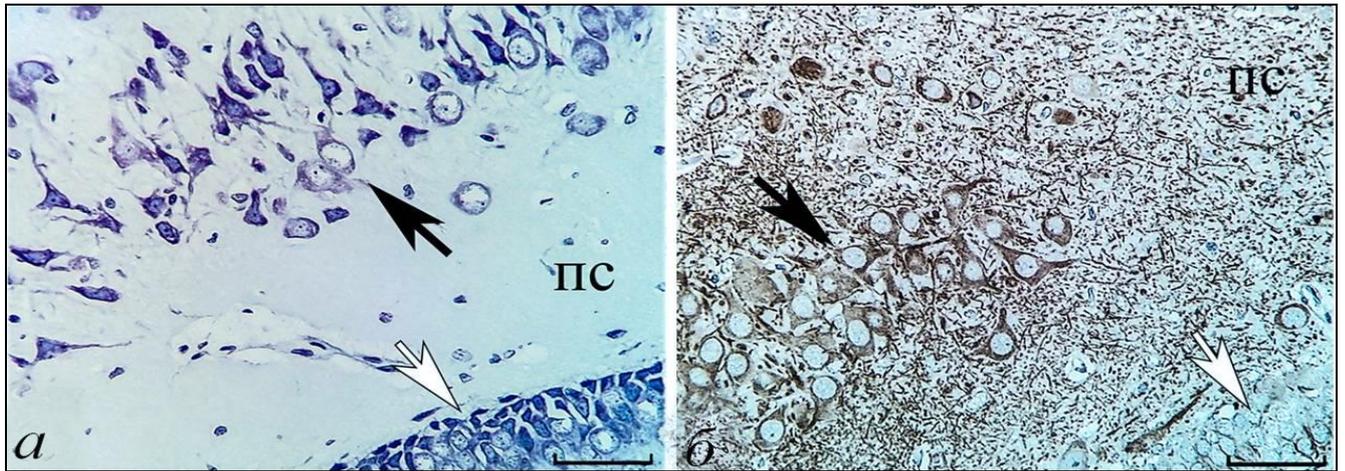


Рисунок 30 – Зубчатая извилина гиппокампа белых крыс, контроль:
 а – гематоксилин-эозином; б – иммуногистохимия, MAP-2. Белые стрелки -
 гранулярный, * – молекулярный, ПС – полиморфный слой. Объектив: × 40,
 шкала – 60 мкм

Таблица 8 – Морфометрическая характеристика нейронов и астроцитов зубчатой извилины и СА₄ гиппокампа головного мозга белых крыс в контроле, окраска по Нисслию, Q2 (Q1-Q2)

Показатели	Отдел гиппокампальной формации	
	зубчатая извилина	СА ₄
Общая численная плотность нейронов, на 1 мм ²	6 154 (5 550–6 408)*	1 430 (1 256–1 495)
Площадь перикариона, мкм ²	52,8 (48,4–56,5)*	2 14,3 (178,3–232,8)
Площадь ядра, мкм ²	40,4 (38,2–41,1)*	116,9 (98,8–133,5)
Расстояние между ядрышками нейронов, мкм	10,5 (9,9–10,7)*	26,8 (15,3–37,5)
Общая численная плотность глиоцитов, на 1 мм ² сектора	1 705,7 (1 567,1–1 799,8)	1 722,2 (1 498,5–1 812,4)
Площадь тела астроцита, мкм ²	39,2 (35,5–40,9)	37,2 (34,3–41,9)
Нейроглиальный индекс, от.ед.	0,27 (0,26–0,43)*	1,2 (0,8–1,3)
Примечания: * Различия в сравнении с СА ₄ статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона для двух зависимых выборок). Q2 – медиана, Q1 – нижний, Q3 – верхний квартили. ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение (площадь ядра/площадь цитоплазмы).		

После 20 мин ООСА в ЗИ и СА₄ на протяжении всего постишемического периода выявляли нормохромные и гиперхромные нейроны (Рисунок 29 а). Максимальное содержание гиперхромных нейронов отмечали через 3 сут после восстановления кровотока (ЗИ – 15,5 %, СА₄ – 53,2 %). Преобладали несморщенные нейроны, содержание необратимо измененных гиперхромных сморщенных (пикноморфных) нейронов с гомогенизацией ядра и цитоплазмы в этот срок было на уровне 2,0–2,5 % (ЗИ) и 3–5 % (поле СА₄). Таким образом, доля типичных нормохромных нейронов после 20 мин ООСА сначала (1 и 3 сут) уменьшалась, а затем увеличивалась (7, 14 и 30 сут). При этом в поле СА₄ статистически значимые различия по содержанию нормохромных нейронов сохранялись и в позднем периоде (Таблица. 9).



Примечание: Белые стрелки – гранулярный, ПС – полиморфный слой зубчатой извилины; черные стрелки – нейроны поля СА₄. Объектив: × 40, шкала – 60 мкм

Рисунок 31 – Поле СА₄ и ЗИ гиппокампа белых крыс, 1 сут после 20 мин ООСА:

а – нормо- и гиперхромные нейроны (окраска по Нисслю);

б – иммуногистохимия (МАР-2)

Таблица 9 – Численная плотность нормохромных нейронов в зубчатой извилине и СА₄ гиппокампа (на 1 мм² поля зрения) в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q3)

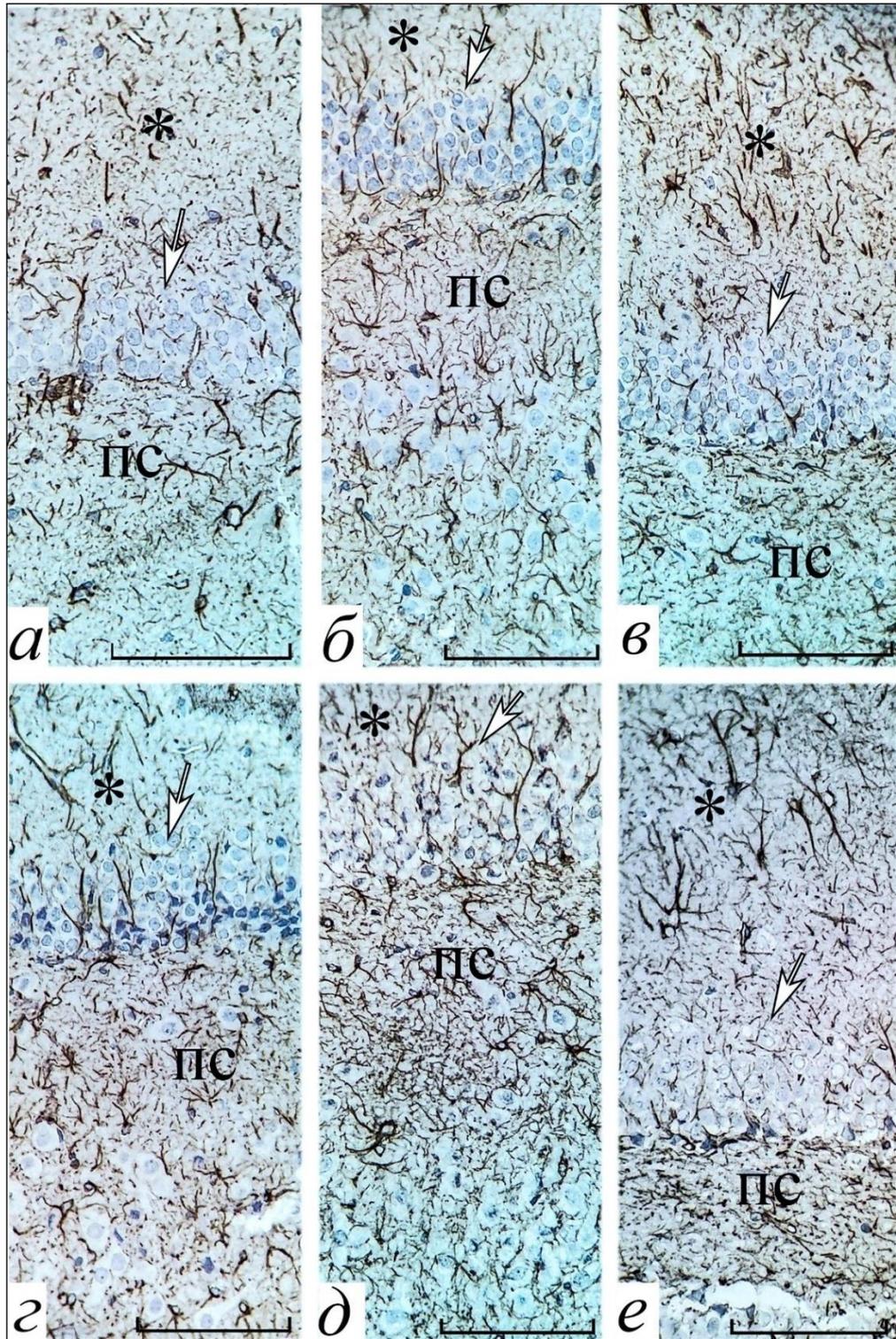
Группы	Отделы	
	ЗИ	СА ₄
контроль	6 001 (5 420–6 204)	1 409 (1 172–1 488)
После ООСА		
1 сут	4 941 (4 745–5 102)*	886 (805–1 009)*
3 сут	4 470 (4 234–4 555)*^	659 (554–755)*^
7 сут	5 485 (5 356–5 878)	747 (543–897)*
14 сут	5 533 (5 235–5 902)	1 005 (897–1 230)*^
30 сут	5 731 (5 672–5 876)	1 155 (754–1 432)*
Примечание: * Различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – сравнение с предыдущим сроком (критерии Манна – Уитни); различия статистически значимы при $p < 0,05$. Примечание. Q2 – медиана, Q1 – нижний, Q3 – верхний квантили.		

В поле CA_4 через 1, 3, 7 и 14 сут после 20 мин ООСА общая численная плотность нейронов (ОЧПН) статистически значимо не изменялась. Только через 30 сут дефицит ОЧПН составил 5,3 % (критерий Манна – Уитни, $p < 0,05$). В ЗИ значимых изменений ОЧПН на протяжении всего периода наблюдения выявлено не было. Таким образом, после 20 мин ООСА в изученных отделах гиппокампа ОЧПН оставалась на близком к контролю уровне.

При иммуногистохимическом светооптическом исследовании ЗИ в контроле и после 20 мин ООСА выявили неоднородное распределение *GFAP*-позитивного материала: максимально в полиморфном, минимально – в гранулярном слое (Рисунок 30).

В ЗИ *GFAP*-позитивный материал выявляли преимущественно в телах и отростках фиброзных астроцитов (ФА) (см. Рисунок 30). Эти астроциты имели древовидную организацию: небольшое тело (диаметр 7–13 мкм), длинные (чаще в молекулярном и гранулярном слоях) или короткие (чаще в полиморфном слое), гладкие слаборазветвленные отростки с очень высокой плотностью хромогена. ФА занимали неперекрывающиеся или слегка перекрывающиеся пространственные области (домены), которые были заполнены толстыми и тонкими ветвями отростков. Наиболее крупные ФА с толстыми отростками выявляли в молекулярном слое ЗИ через 14 и 30 сут после 20 мин ООСА (Рисунок 30*д, е*). ФА в гранулярном и молекулярном слоях имели характерные длинные прямые отростки в поперечном направлении. В полиморфном слое преобладали ФА с короткими отростками без преобладающего направления (см. Рисунок 30).

Протоплазматические астроциты (ПА) выявляли преимущественно вокруг полиморфных нейронов и в молекулярном слое поля CA_4 (Рисунок 31). Для этих клеток было характерно относительно крупное тело, толстые короткие первичные отростки с неровными контурами, рыхлое заполнение хромогеном и большое количество очень мелких отростков. Мелкие астроцитарные отростки выглядели как хаотический рисунок с невысокой оптической плотностью хромогена (см. Рисунок 31*а*). ПА, как и ФА были связаны с кровеносными сосудами (см. Рисунок 31*б*).

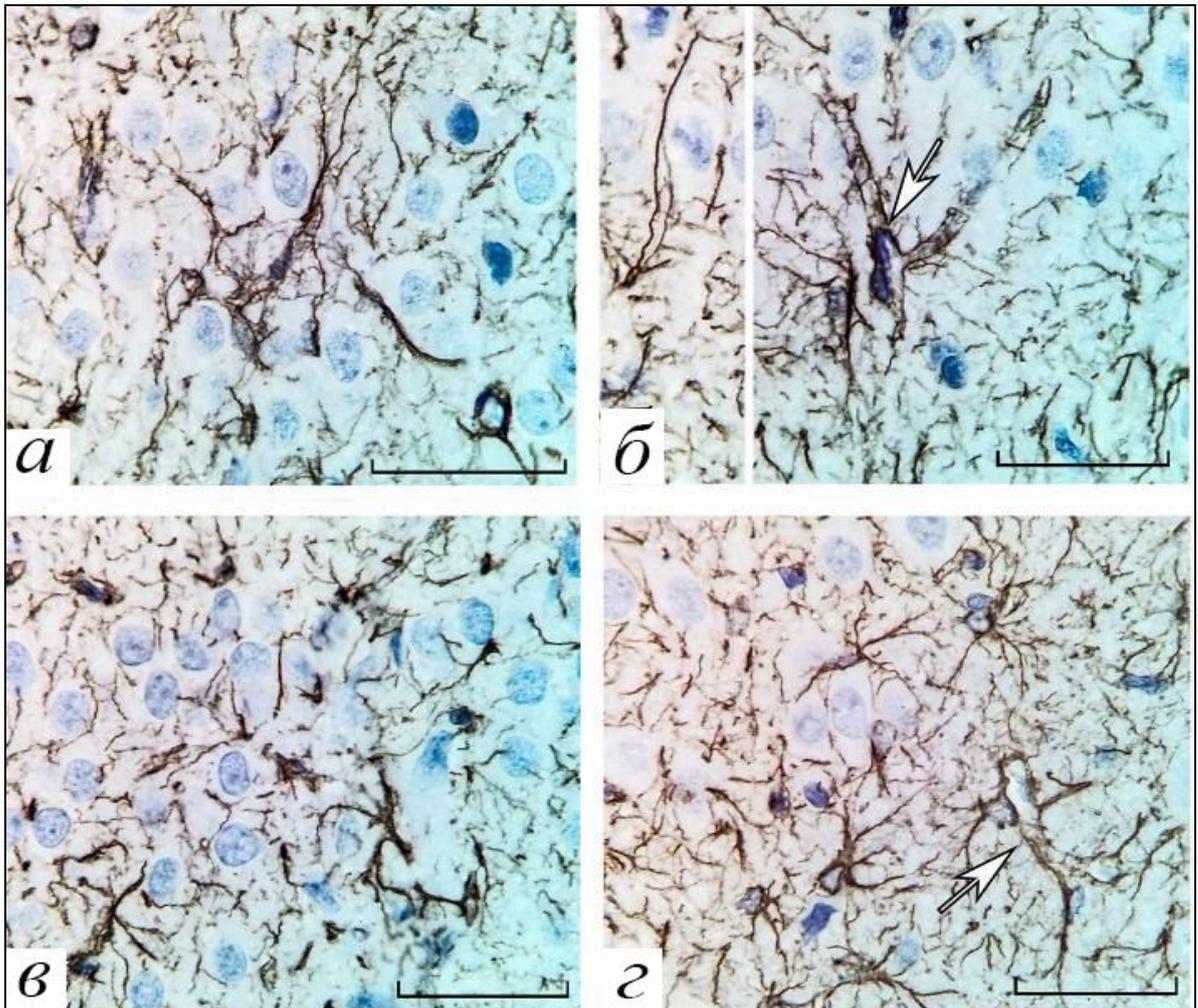


Примечание: Белые стрелки – гранулярный слой, * – молекулярный слой, ПС – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимическая реакция на *GFAP*, докраска гематоксилином, объектив $\times 40$, шкала – 100 мкм.

Рисунок 32 – Фронтальные срезы головного мозга на уровне гиппокампа: неравномерное распределение хромогена в слоях зубчатой извилины в контроле (а), через 6 ч (б), 1 сут (в), 3 сут (г), 14 сут (д) и 30 сут (е) после 20 мин ООСА

После 20 мин ООСА увеличивалось количество реактивно измененных астроцитов – и протоплазматических, и фиброзных. Для этих клеток было характерно: высокая очаговая плотность распределения, гипертрофия отростков (утолщение, удлинение) и усложнение фиброархитектоники (см. Рисунки 31 и 32).

В контроле, по данным классического морфометрического анализа, относительная площадь частиц хромогена (в единице поля зрения) минимальной была в гранулярном, а максимальной – в полиморфном слое ЗИ (Таблица 10).



Примечание: Белые стрелки – микрососуды. Окраска: иммуногистохимическая реакция на *GFAP*, докраска гематоксилином, объектив× 100, шкала – 25 мкм.

Рисунок 33 – Протоплазматические астроциты CA_4 через 6 ч после 20 мин ООСА: а – большое количество мелких отростков на основных стволах, б – структурная связь отростков астроцитов с микрососудом, в, г – увеличение плотности распределения астроцитов между нейронами и их домены (г)

Через 1 сут после 20 мин ООСА во всех слоях ЗИ выявляли незначительное (на 5–6 %), но статистически значимое увеличение этого показателя. Подобные реактивные изменения длительно сохранялись. Максимальное увеличение площади *GFAP* (на 10,7 % в сравнении с контролем) отмечали через 14 сут после 20 мин ООСА в полиморфном слое (см. Таблицу 10).

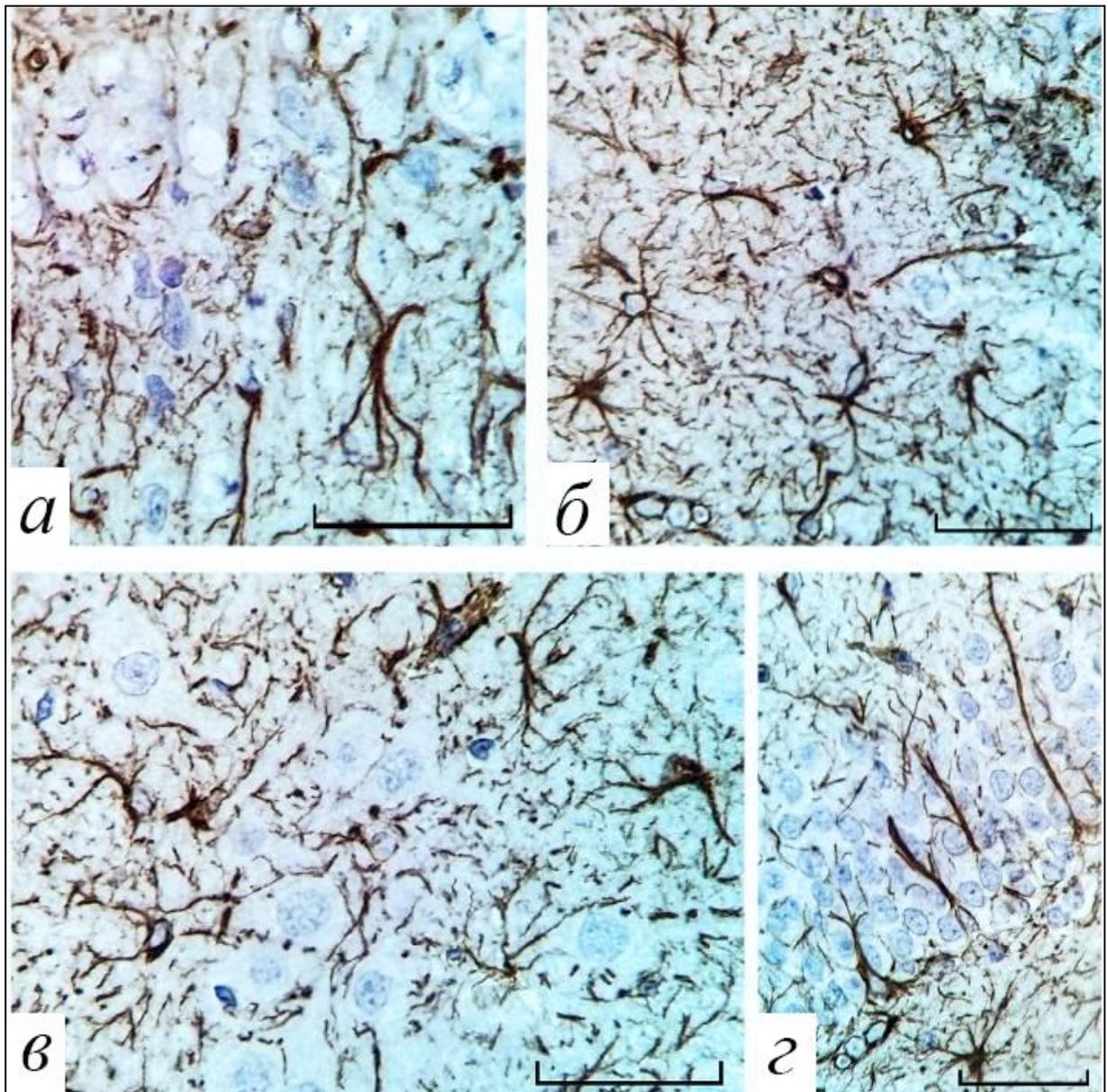


Рисунок 34 – Фиброзные астроциты зубчатой извилины и CA₄ через 1 сут после 20 мин ООСА: а – гипертрофия отростков астроцитов в молекулярном слое зубчатой извилины, б – увеличение плотности распределения астроцитов в полиморфном слое, в – увеличение плотности распределения астроцитов внутри клеточного слоя CA₄, г – гипертрофия отростков астроцитов в гранулярном слое зубчатой извилины. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином, объектив × 100, шкала – 25 мкм

Таблица 10 – Относительная площадь (%) хромогена при иммуногистохимическом выявлении (*GFAP*) элементов глияльной сети зубчатой извилины у животных контрольной и основной группы, Q2 (Q1-Q3)

Группы	Слои измерения			
	все (суммарно)	молекулярный	гранулярный	полиморфный
контроль	13,2 (10,8–14,2)	10,9 (8,9–13,3)	9,8 (8,9–12,1)	15,8 (13,4–17,3)#
После ООСА				
1 сут	17,8 (16,5–19,9)*^	17,5 (15,9–20,3)*^	16,7 (13,8–18,7)*^	20,4 (18,8–23,2)*
3 сут	14,9 (10,5–17,8)	12,0 (10,1–14,6)^	15,2 (13,6–17,9)*	16,0 (13,7–19,2)#
7 сут	14,6 (13,4–17,5)	10,6 (9,1–13,5)	10,3 (9,7–13,4)^	20,2 (16,8–23,3)*^#
14 сут	21,3 (19,5–25,3)*^	16,6 (15,1–19,9)*^	16,7 (14,8–20,2)*^	26,3 (22,8–28,5)*#
30 сут	17,3 (14,8–20,5)*	16,3 (14,2–18,5)*	10,5 (9,1–15,5)#^	21,7 (18,6–24,5)*^#
Примечание: * Различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – в сравнении с предыдущим сроком (критерий Манна – Уитни), # – в сравнении с молекулярным слоем (критерий Вилкоксона) при $p < 0,05$.				

Для дополнительной количественной характеристики астроцитов, включающей оценку не только площади, но и формы, распределения их отростков в пространстве мы использовали фрактальный анализ молекулярного и полиморфного слоев ЗИ. Согласно его результатам, в контроле показатели заполнения пространства фрактальными структурами (иммунореактивные к *GFAP* отростки и тела астроцитов) в этих слоях статистически значимо различались. В полиморфном слое была больше фрактальная размерность (ФР) (Таблица 11) и меньше лакуарность (Таблица 12). Это свидетельствовало о большем заполнении пространства полиморфного слоя отростками астроцитов.

В динамике постишемического периода были выявлены статистически значимые изменения обеих переменных, характеризующих пространственное

распределение *GFAP*-позитивного материала ЗИ (см. Таблицы 11 и 12).

Таблица 11 – Фрактальная размерность (ФР) глиальной (*GFAP*) сети различных слоев зубчатой извилины в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q3)

Группы	Слой зубчатой извилины	
	молекулярный	полиморфный
контроль	1,56 (1,47–1,62)	1,67 (1,59–1,72)#
После ООСА		
1 сут	1,77 (1,68–1,83)*^	1,79 (1,69–1,84)*
3 сут	1,55 (1,43–1,61)^	1,62 (1,49–1,68)^#
7 сут	1,57 (1,51–1,66)	1,73 (1,60–1,79)^#
14 сут	1,67 (1,58–1,73)*	1,82 (1,66–1,89)*^#
30 сут	1,74 (1,62–1,81)*^	1,72 (1,65–1,78)^
Примечание: * Различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – в сравнении с предыдущим сроком (критерий Манна – Уитни), # – в сравнении с молекулярным слоем (критерий Вилкоксона) при $p < 0,05$.		

Таблица 12 – Лакунарность (Λ) глиальной сети различных слоев зубчатой извилины в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q3)

Группы	Слой зубчатой извилины	
	молекулярный	полиморфный
контроль	0,55 (0,49–0,57)	0,46 (0,41–0,50)
После ООСА		
1 сут	0,39 (0,36–0,47)*^	0,35 (0,32–0,42)*
3 сут	0,66 (0,60–0,71)*^	0,56 (0,50–0,62)*^#
7 сут	0,76 (0,68–0,79)*^	0,35 (0,30–0,48)*^#
14 сут	0,59 (0,50–0,62)^	0,32 (0,29–0,38)*#
30 сут	0,36 (0,33–0,46)*^	0,34 (0,31–0,42)*
Примечание: * Различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – в сравнении с предыдущим сроком (критерий Манна – Уитни), # – в сравнении с молекулярным слоем (критерий Вилкоксона) при $p < 0,05$.		

Через 1 сут после 20 мин ООСА, в сравнении с контролем, в молекулярном и полиморфном слоях ЗИ увеличивалась ФР, а лакуарность уменьшалась (см. Таблицы 4 и 5). Через 6 ч, 3, 7, 14 и 30 сут отмечали гетерохронные и гетероморфные изменения ФР и лакуарности в изученных слоях. Кроме того, через 6 ч, 3, 7 и 14 сут в полиморфном слое ФР была выше, а лакуарность ниже, чем в молекулярном слое. Это, вероятно, свидетельствовало о неравномерной реактивной реорганизации астроцитарных отростков в ответ на ишемию и реперфузию появлении зон с более высокой плотностью и плотным равномерным заполнением пространства за счет разветвления тонких периферических отростков.

Следовательно, фрактальный анализ подтвердил то, что после 20 мин ООСА в ЗИ происходила гипертрофическая неравномерная пространственная реорганизация реактивных астроцитов (очаговый астроглиоз).

Таким образом, после 20 мин ООСА в зубчатой извилине и поле СА₄ белых крыс увеличивалась плотность *GFAP*-позитивного материала, усложнялась реорганизация фиброархитектоники за счет разветвления отростков астроцитов. Это происходило на фоне незначительного уменьшения общей численной плотности нейронов. Как и в полях СА₁ и СА₃ выявлена количественная гетерогенность и гетерохронность изменений пространственной организации астроцитарных отростков в молекулярном и полиморфном слоях ЗИ. Более лабильными и реактивными были мелкие отростки астроцитов. В отдаленном периоде (14 и 30 сут) после 20 мин ООСА сохранялась повышенная плотность отростков фиброзных астроцитов и общего содержания *GFAP*-позитивного материала. Максимальные значения характеристик были выявлены в полиморфном слое. В этот период мера структурной сложности глиальных сетей была существенно выше, а лакуарность ниже, чем в контроле и через 3 и 7 сут постишемического периода. Однако, в нашем исследовании, при отсутствии выраженных очагов некроза и небольшом дефиците нейронов, увеличение площади реактивных фиброзных астроцитов следует рассматривать как свидетельство активации естественных защитных функций астроглии, направленное на сохранение и восстановление поврежденных нейронов.

На основании проведенного фрактального анализа астроцитарной сети полей CA₁ и CA₃ гиппокампа и зубчатой извилины нами делается общее важное заключение: реакция астроцитов разных отделов гиппокампа на 20 мин ООСА отличалась. Имелись различия по степени изменений и времени их появления (Рисунки 33 и 34).

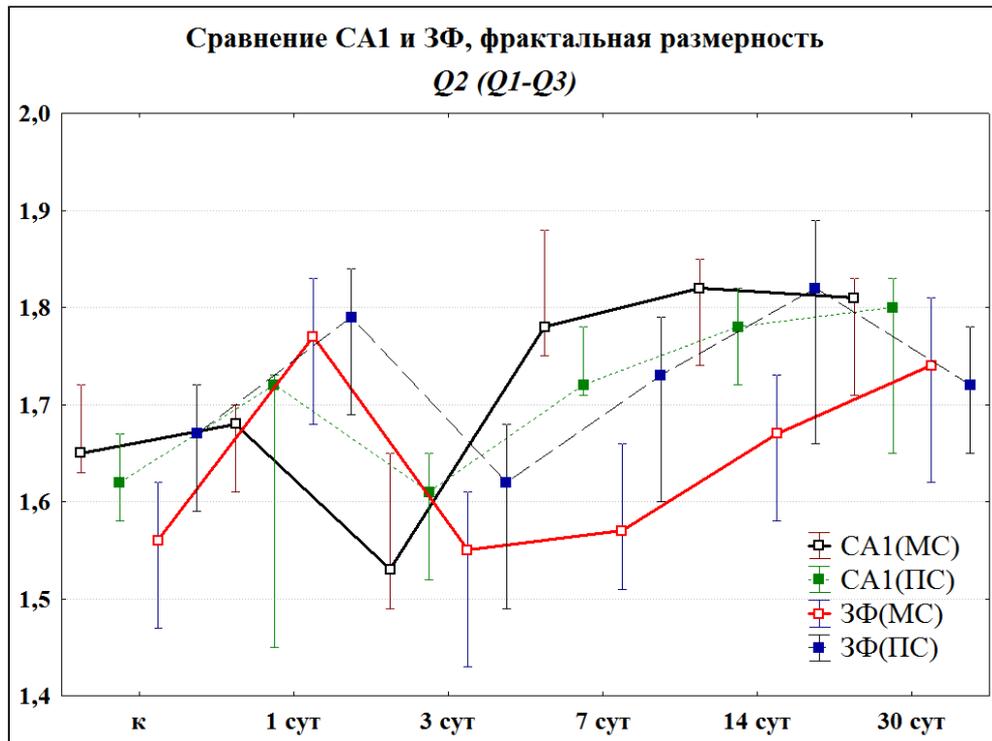


Рисунок 35 – Наглядное представление сравнения динамики фрактальной размерности астроцитарной сети поля CA₁ и ЗИ: критический период – через 3 сут

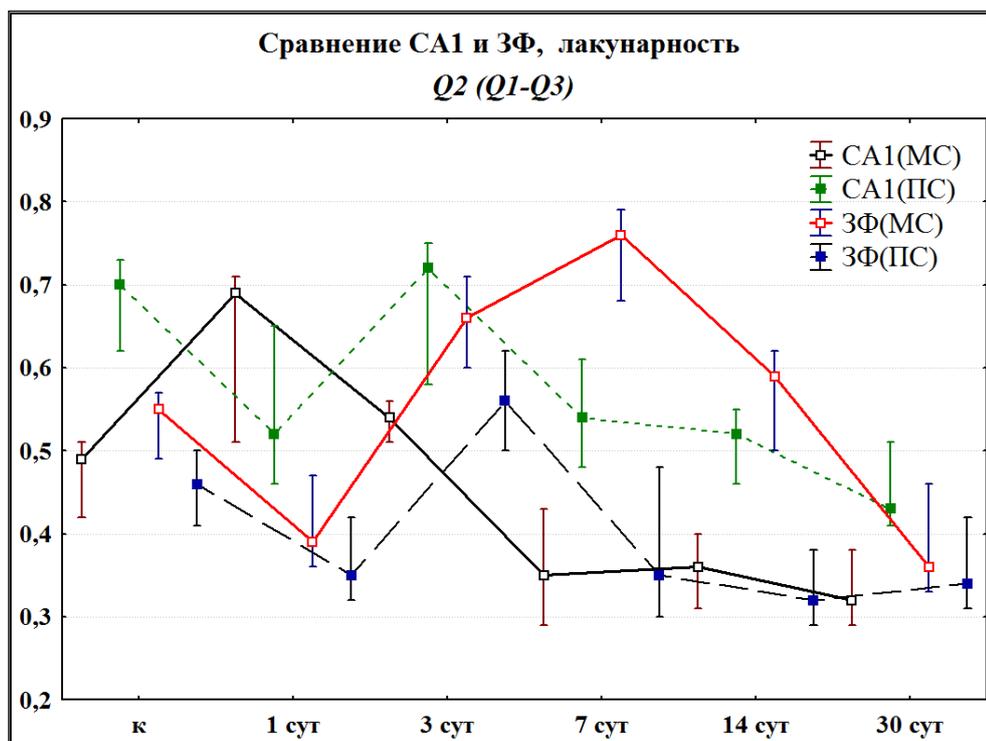


Рисунок 36 – Наглядное представление сравнения динамики лакуарности астроцитарной сети поля CA₁ и ЗИ: критический период – через 1 сут

Минимальный разброс показателей переменных отмечен в контроле и через 30 сут после 20 мин ООСА. Это свидетельствовало о длительной перманентной реорганизации астроцитов в пространстве гиппокампа. А их индивидуальная динамика подтверждала наше предположение о гетерогенности и гетерохронности реакции астроцитов на 20 мин ООСА.

Таким образом, при изучении нейронов и нейроглиоцитов в гиппокампе выявлена синхронная реорганизация основных структурных компонентов нервной ткани гиппокампа (Рисунок 35) в ответ на 20 мин ООСА.

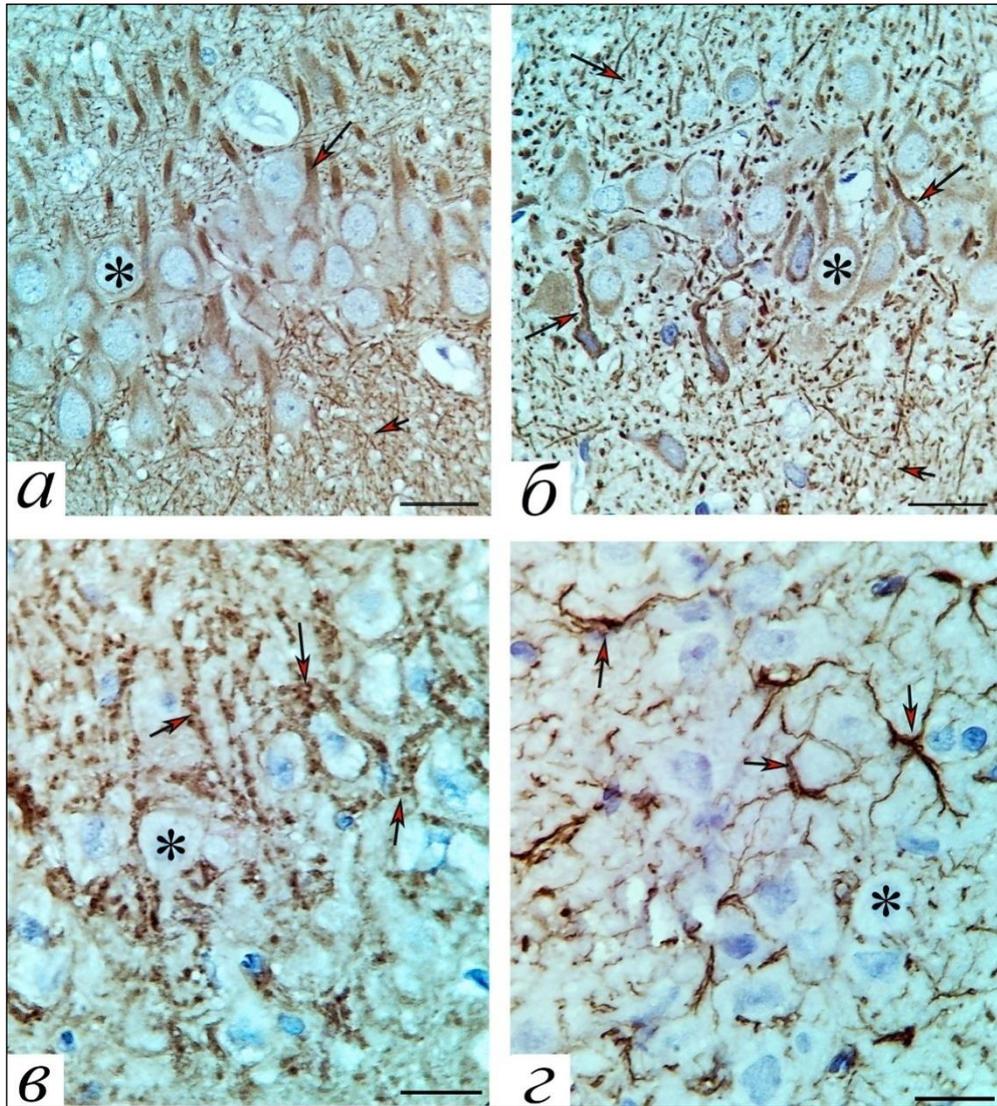


Рисунок 37 – Основные участники процесса реорганизации межклеточных взаимоотношений в гиппокампе после 20 мин ООСА: а – нейроны слоя CA₁, б – нейроны слоя CA₃, в – синаптические терминалы, г – астроциты. * – перикарионы, стрелки – локализация меток MAP-2, p38 и GFAP. Окраска: иммуногистохимическая реакция на MAP-2, p38 и GFAP, докраска гематоксилином. Объектив × 100, шкала – 20 мкм

После 20 мин ООСА дистрофические и нейродегенеративные изменения нейронов (темные нейроны, уменьшение общей численной плотности нейронов) приводили к активации дренажно-детоксикационной системы (проявления отека-набухания нейропиля, астроцитарных отростков), гиперплазии и

гипертрофии астроцитов (изменения показателей фрактального распределения и лакунарности астроцитарной сети, слабые и умеренные проявления астроглиоза), а также активации микроглиоцитов и олигодендроцитов. Большинство дегенеративно измененных темных нейронов являются вариантом обратимого изменения клетки в ответ на умеренное ишемическое воздействие. В пользу этого свидетельствовала сохранность специфических белков цитоскелета (*MAP-2*), системы коммуникации (*p38*). На этом фоне происходит сначала гибель (уменьшение общей численной плотности и относительной площади меток *p38*), а затем регенерация пула синаптических контактов (увеличение содержания *p38* выше контрольного уровня), сопровождающаяся высоким уровнем содержания каспазы-3 в терминалях. В этой связи, и по данным литературных источников, имеются основания полагать, что данный протеолитический фермент имеет более широкие, чем участие в апоптозе, функции. Вероятно, при небольшом объеме диффузно-очаговой дегенерации нервной ткани, когда поврежденные нейроны не являются угрозой для неповрежденных нейронов, каспаза-3 становится одним из механизмов нейропластичности, а не утилизации.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

За последние десять лет произошел значительный подъем количества публикаций по изучению морфофункционального состояния неравной ткани головного мозга экспериментальных животных при ишемии и в постишемическом периоде. Основным трендом стало изучение закономерностей синхронных проявлений реорганизации нейронов, нейроглии и микрососудов в компенсаторно-восстановительных процессах. Только одновременное изучение нейронов, астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов позволяет моделировать происходящие процессы нейропластичности. При этом нейроглия рассматривается как полноценный участник феномена нейропластичности [118; 139; 164; 201]. Какие эффекты (благоприятные или нет) преобладают при активации нейроглии зависит от характеристик повреждения [139]. Ведется поиск способов коррекции изменений нейроглии для восстановления поврежденных нейронов [72].

Несмотря на противоречивые данные разных авторов [142; 211] относительно реализации защитных механизмов в головном мозге, не вызывает сомнения то, что определенная модуляция микроглиоцитов, астроцитов подавляет нейродегенеративные каскады, которые инициируются ишемическим повреждением, и способствует функциональному восстановлению нервной ткани посредством выделения трофических факторов, противовоспалительных цитокинов и активации олигодендроцитов [201]. В связи с этим активно изучаются молекулярно-генетические механизмы этого явления [118; 164; 171].

Несмотря на успехи в лечении черепно-мозговой травмы и инсультов, в настоящее время все еще нет нейропротекторов, способных противодействовать вторичному или отсроченному повреждению головного мозга или стимулировать его восстановление. Большие надежды ранее возлагались на развитие методов клеточной заместительной терапии [109]. Но за последние 18 лет, несмотря на огромные материальные затраты, не найдены способы накопления значительных (терапевтических) объемов клеточных линий, потенциально способных к

трансплантации в ЦНС для коррекции отсроченных нейродегенеративных процессов.

Как следствие, этап надежды на простое решение проблемы, путем пересадки клеток или стимуляции стволовых клеток мозга, сменился новым поиском возможного направления и материального субстрата – использование нейропротекторного потенциала нейроглиальных клеток [98; 196].

В эксперименте установлено, что нейроглиальные клетки могут контролировать развитие, структурирование и функционирование нейронных сетей путем регуляции мозгового кровотока. Существует гетерогенная генетическая детерминация астроглии и микроглии (различные клеточные фенотипы и поведение), направленная на защиту или деструкцию поврежденных нейронов. Большое значение имеет функциональная и структурная устойчивость нейроглии к ишемическим состояниям, а также их способность приобретать нужный в конкретный момент (правильный) фенотип в зависимости от силы, времени и продолжительности патологического фактора [196].

Появляются работы, направленные на поиск средств и технологий прямого перепрограммирования глиальных клеток в нейроны [98]. В случае успеха появится беспрецедентная возможность восстанавливать поврежденные структуры мозга с помощью новой формы нейрогенеза (глия – нейрон) и использования аутологичных клеток, которые уже интегрированы во внеклеточный матрикс ткани хозяина [98].

Таким образом, пластичность определяется не только нейронами, но и астроцитами, микроглией. На сегодняшний день известно, что астроциты способствуют такой пластичности двумя способами: во-первых, выступая в качестве стволовых нейроглиальных клеток (NSC), дающих начало новым нейронам и глиальным клеткам, во-вторых, выступая в качестве нишевых клеток, которые контролируют активность стволовых нейроглиальных клеток и обеспечивают структурную и функциональную поддержку нейронам. Модифицируя активность астроцитов, можно повлиять на течение и исход патологических процессов, запускаемых при ишемическом повреждении [25;

221]. Однако, несмотря на их защитную роль, лечебные стратегии, специально нацеленные на астроциты микроглию, еще не разработаны, а это направление еще долго будет оставаться перспективным.

Таким образом, астроциты, микроглиоциты и олигодендроциты хорошо приспособлены для непосредственного восприятия активности отдельных нейронов и нейронных цепей, играют важную роль в регуляции адаптивной нейропластичности и обеспечения нейропротекции после ишемии. Поэтому именно в аспекте изучения естественных механизмов нейропротекции и единства всех клеточных систем гиппокампа целесообразно обсуждать полученные нами данные. Особое значение при этом мы уделяем нейроглиальным взаимоотношениям.

В работе использовалась модель острой неполной ишемии, вызванная 20 мин ООСА без гипотонии. Выбор этой модели был обусловлен тем, что с ее помощью можно изучать диффузно-мелкоочаговые изменения в гиппокампе и сравнивать его отделы [42]. Отсутствие крупных очагов некроза подтверждено с помощью окраски 2,3,5-трифенилтетразолием хлорида. Подобных работ в доступных базах данных мы не выявили, исследовались более тяжелые состояния при длительной перевязке ООСА [8] или при окклюзии средней мозговой артерии [160; 161].

Установлено, что CA₁, CA₃, CA₄ и зубчатая извилина головного мозга белых крыс в норме статистически значимо отличались по количественным параметрам нейрорито-, глиоцито- и синаптоархитектоники, ядерно-цитоплазматическому и нейроглиальному отношениям. Это важно, так как позволяет предположить наличие влияния данных факторов на исход ишемического воздействия.

Использование оригинальной комбинации плагинов программы ImageJ 1.53 – «Morphological Filters» из пакета «Morpho Lib J» и «Find Maxima» при анализе цветных изображений, полученных при окраске гематоксилин-эозином, позволило провести морфологическую сегментацию объекта изучения по зонам яркости. Было установлено, что после 20 мин ООСА в гиппокампе увеличивалась степень гидратации нервной ткани. На другой модели – черепно-мозговой травме

мы предполагали, что часть химически связанной с макромолекулами воды после воздействия переходила в состояние свободной формы и перераспределялась между нервными, глиальными клетками и межклеточным пространством (мелкоочаговый отек) [34; 35; 49]. После травматического и ишемического воздействия на головной мозг, вероятно, существует два основных направления потоков свободной воды из нейронов в глиоциты: 1) на уровне отростков (в нейропиле) и 2) из тел нейронов (клеточные слои) в перичеселлюлярные пространства. При этом в одних случаях выход воды из нейронов осуществляется только из отростков, а в других задействованы оба направления. Вполне вероятно, что это может каким-то образом влиять на исход ишемического повреждения нейронов [34; 35].

По нашим и литературным данным, в процессе обратимой и необратимой гидропической дистрофии изменения нейронов развивались так: набухание \Rightarrow отек \Rightarrow резорбция свободной воды из тела и отростков нейронов в компартмент нейроглиальных клеток (преимущественно плазматических астроцитов) \Rightarrow перенос в периваскулярные пространства \Rightarrow резорбция из глиальных клеток в сосуды. Часть свободной воды, вероятно, сохраняется в межклеточных пространствах. Все это происходило в остром периоде на фоне дистрофических и некробиотических повреждений нейронов и астроцитов, а также дисфункции гематоэнцефалического барьера [67; 198].

Разные поля гиппокампа отличались реактивностью дренажно-детоксикационной функции – в поле CA_3 она была выше, чем CA_1 , в норме. Это могло быть одной из причин разной чувствительности к ишемии пирамидных нейронов поля CA_1 и CA_3 , описанной ранее другими авторами [75]. Вполне вероятно, что найденное нами сочетание высокой реактивности дренажно-детоксикационной функции и длительное сохранение высокой гидратации нейронов и отростков астроцитов в нейропиле можно рассматривать как возможный механизм саногенеза после ишемии и травмы. Происходило своеобразное растворение токсинов в несвязанной воде. При этом в поле CA_3 имело место более полное удаление «ишемических токсинов», чем в поле CA_1

гиппокампа. В этом направлении необходимо проведение дальнейших экспериментальных исследований [34; 35; 49]. Мы полагаем, что одной из причин различия CA_1 и CA_3 была плотность пирамидных нейронов. Большая плотность нейронов в CA_1 требовала наличия более активной дренажно-детоксикационной системы.

По нашим данным, прижизненные дегенеративные изменения после 20 мин ООСА были в основном связаны с образованием так называемых «темных нейронов», разрушением дендритов и синаптических терминалей. Изменения были мелкоочаговыми, имели гетерохронный и гетероморфный характер. Элиминация дегенеративно измененных темных нейронов происходила на протяжении всего изученного периода путем фагоцитоза, с пиком на 1–3 сут. В этот период элиминация остатков темных нейронов происходила за счет механизмов коагуляционного некроза (сморщенные темные нейроны) и их фагоцитоза. Иммуногистохимические проявления апоптоза выявлялись в единичных нейронах. Каспаза-3 имела высокую активность только в аксонах и синаптических терминалях, что связано с ее участием в адаптационных и восстановительных процессах. Вполне вероятно, что большая часть поврежденных нейронов (включая и апоптотически измененные) разрушалась в более раннем постишемическом периоде (в течение 1 сут). В пользу этого свидетельствуют наши данные по динамике изменения общей численной плотности нейронов. Особенно наглядно подобный тренд отмечался для поля CA_1 (см. Рисунок 12).

По литературным данным, в перифокальной зоне после черепно-мозговой травмы, соответствующей по изменениям диффузно-очаговым повреждениям, именно в течение 24 ч после травмы происходят главные определяющие события [241]. Несомненно, 20 мин ООСА, как и любая другая острая ишемия, приводит к гибели части нейронов путем образования гиперхромных нейронов и фагоцитоза, а структурные проявления этого отмечаются в течение длительного времени [219; 241]. Однако, не все темные нейроны при этом погибают, а процессом их элиминации можно управлять [65; 179].

Нами установлено, что после 20 мин ООСА в изученных отделах гиппокампа параллельно отмечались структурные проявления механизмов необратимого повреждения и компенсаторно-восстановительной реорганизации нейроглиальных комплексов. Реактивный астроглиоз являлся основной частью этой реорганизации. Через 3 и 7 сут после 20 мин ООСА, на фоне повреждения нейронов, во всех отделах активировалась пролиферация нейроглии и клеток микрососудов (Ki-67), усиливалась экспрессия GFAP, увеличивался нейроглиальный индекс, появлялось большое количество клеток-сателлитов и реактивных микроглиоцитов. Астроглиоз проявлялся усложнением реорганизации астроглиоархитектоники за счет разветвления мелких отростков астроцитов. В разных отделах гиппокампа эти изменения различались по степени и времени их проявления. Максимальный перепад переменных «фрактальная размерность» и «лакунарность», характеризующих долю и форму отростков в пространстве, отмечен в молекулярном слое гиппокампа.

Что отражают найденные изменения астроглиоархитектоники? Меняется количество и степень разветвленности отростков астроцитов. Мы полагаем, что это является структурным проявлением процесса адаптации нейронной сети к новым условиям функционирования после повреждения и элиминации некоторой части нейронов. Астроцитарная сеть подстраивается под потребности нейронной сети, а они заключаются в необходимости усиления синаптической пластичности для обеспечения восстановления функций гиппокампа.

Синаптическая пластичность – одна из самых фундаментальных и важных функций мозга. Эффективность передачи в синапсе зависит от модуляции межнейронных связей нейросети множеством внутренних и внешних факторов в процессе адаптации к окружающей среде. При этом один из путей модуляции синапсов обусловлен активностью нейроглии [244]. Известно, что стресс вообще и ишемический стресс в частности оказывают глубокое влияние на синаптическую пластичность гиппокампа, и это влияние различно в подполях гиппокампа. Например, стресс снижает LTP в CA₃, одновременно облегчая LTD в CA₁ [167]. Кроме того, LTD может влиять на синаптические белки и факторы

роста, необходимые для LTP гиппокампа [244]. Нами как раз и показано, что пространственная реорганизация отростков астроцитов индивидуальна для слоев полей гиппокампа.

Несомненно, что активация нейронной пластичности является жизненно важной характеристикой мозга в ответ на острую ишемию, а ее реализация связана с изменением баланса LTP и LTD. Все это должно иметь какие-то морфологические эквиваленты. Многочисленные клинические и фундаментальные исследования выявили корреляции между нейропластичностью и депрессией [244]. Влияние депрессии (например, постишемической) на нейронную пластичность представляет собой сложные патофизиологические процессы, включающие множество областей головного мозга – гиппокамп, префронтальная кора и миндалевидное тело, а также сложные взаимодействия различных сигнальных путей – такие как NMDA, глутамат, адренергические, глюкокортикоиды и эстрогены. С другой стороны, изменения нейропластичности, вызванные ишемией, могут способствовать возникновению и развитию депрессии. Поэтому закономерно, что большинство методов лечения постишемической энцефалопатии оказывают антидепрессивное действие, связанное с нейропластичностью. К сожалению, на сегодняшний день не найдено идеального и полностью эффективного средства коррекции нарушенного баланса LTP и LTD, следовательно, и лечения пациентов, перенесших эпизод острой ишемии [172; 244].

Необходимо отметить, что все вышеназванные достижения в изучении нейропластичности связаны с гиппокампом и прилежащим областям головного мозга (миндалевидное тело, периформная кора, некоторые ядра) [172].

Для гиппокампа были открыты эпигенетические эффекты, которые приводят, посредством комплекса рецепторов и сигнальных путей, к постоянно меняющимся паттернам экспрессии генов. В результате изменились представления о природе нарушений работы мозга при психических расстройствах, старение, при воздействии неблагоприятных факторов и требует дальнейшего изучения [172].

Появились новые перспективы для терапевтических вмешательств, которые помогают мозгу адаптироваться к стрессорам и восстанавливать свои функции [157]. Основная цель этого нового подхода состоит в том, чтобы целенаправленно и длительно контролировать механизмы нейропластичности. Мы полагаем, что найденные нами изменения нейроглиальной сети на протяжении всего периода наблюдения (1–30 сут) можно рассматривать в этом аспекте как естественные механизмы контроля нейропластичности. Вполне вероятно, что реактивный астроглиоз способствует активации синапсов в гиппокампе и других отделах головного мозга. Очевидно, что посредством астроглии контролируется баланс между возбуждающей и тормозной системами, а также удаляются молекулы, которые блокируют нейропластичность. Возможность контроля нейропластичности подтверждена литературными данными [95; 159; 212].

Можно предположить, что адекватная активация астроглии приводит к пространственным изменениям нейросети гиппокампа, периформной коры и миндалины, восстанавливая баланс возбуждающей и тормозной систем в гиппокампальной формации и лимбическом мозге.

В этой связи, большие надежды возлагаются на изучение естественных механизмов модуляции нейронов путем воздействия на нейроглию. Это связано с тем, что в норме и при ишемическом повреждении астроглиальные клетки активно участвуют во всех аспектах жизнедеятельности нервной ткани: обеспечивают питание нейронов, регулируют гомеостаз внеклеточной среды, активность нейронов и уровень кровотока, изменяя диаметр кровеносных сосудов [25; 74]. Кроме того, разные астроциты морфогенетически приспособлены для преимущественного выполнения запрограммированных функций. Поэтому исследование молекулярных механизмов этой гетерогенности необходимо для лучшего понимания нейрон-глиальных взаимодействий в здоровом мозге, а также при развитии различных патологических состояний [56].

В нашей работе, с помощью методов фрактального анализа, выявлена послойная гетерогенность постишемических изменений пространственной организации астроглиальной сети CA₁, CA₃ и зубчатой извилины. То есть, во всех

этих отделах астроглиоз проявлялся по-разному. Наиболее выраженные изменения фрактальной размерности и лакунарности отмечены в молекулярном слое гиппокампа - месте сосредоточения основной части межнейронных синапсов и отростков протоплазматических астроцитов – нейропиле. Реактивные изменения астроцитов сводились к усложнению их доменов и повышению плотности *GFAP*-позитивных структур.

Известно, что протоплазматические астроциты преобладают в сером веществе, имеют множество сложных тонких и супертонких отростков (кустовидная организация), занимающих четкий домен только одной клетки. Эти отростки контактируют с кровеносными капиллярами, формируя периваскулярные ножки, с нейронами, их дендритами, синапсами в нейропиле, с пинальной поверхностью и другими типами нейроглии [62]. Все это делает их уникальными модуляторами функции нейронов, кровеносных капилляров и других типов глии – микроглии и олигодендроглии. Астроциты создают оптимальную среду для функционирования этих клеток [118; 139].

Ранее нами на модели 20 мин ООСА показано, что для объяснения и понимания комплексного функционирования нервной ткани головного мозга в постишемическом периоде целесообразно использовать концепцию нейро-глио-сосудистых комплексов [26; 36].

В этой работе было показано, что после 20 мин ООСА количество нейронов уменьшалось, а содержание глиальных клеток возрастало в 2-3 раза. Увеличение нейроглиального индекса сопровождалось: 1) появлением микрососудов с многочисленными разветвленными отростками перицитов, 2) усложнением пространственной организации базальных мембран, 3) структурными признаками активации процессов транцитоза (большое количество кавеол, гладких и клатриновых везикул, крупных везикул) в перицитах и эндотелиальных клетках. Полученные данные свидетельствовали преимущественно о компенсаторно-восстановительных изменениях компонентов нейро-глио-сосудистых комплексов неокортекса, СА₁ гиппокампа и миндалевидного тела головного мозга белых крыс после 20 мин ООСА. Наиболее полно реализация механизмов защиты и

восстановления поврежденных нейронов отмечалась в неокортексе и миндалевидном теле, для которых характерен высокий нейроглиальный индекс и меньшая, чем в CA_1 плотность пирамидных нейронов [26; 36].

В настоящей работе, кроме того, показано, что гетерогенность и гетерохронность структурных изменений астроглиальной сети имели место и внутри отделов мозга, например, CA_1 и CA_3 , зубчатая извилина по-разному приспособлялись к потере нейронов.

Таким образом, по литературным данным [241] и результатам настоящей работы, можно утверждать, что структурно-функциональная организация гиппокампа (его цито-, дендро-, синапто-, глио-, ангиоархитектоника) оказывает влияние на исход ишемического воздействия.

В результате, например, после травмы в неокортексе количество необратимо измененных нейронов было в два раза меньше, чем количество темных нейронов в более раннем сроке. В гиппокампе количество мертвых нейронов было примерно таким же, как и количество темных нейронов. Эти данные свидетельствуют о том, что почти все темные нейроны гиппокампа неизбежно погибали [241]. По нашим данным, в гиппокампе после 20 мин ООСА больше страдали нейроны CA_1 . В этом поле вероятность необратимой дегенерации для темных нейронов была выше, чем в CA_3 , CA_4 и зубчатой извилины.

Тем не менее, нельзя сводить все объяснения избирательности повреждения нейронов к нейроглиальному индексу. Например, в зубчатой извилине нейронов больше, чем в CA_1 , но они более устойчивы к ишемии за счет каких-то своих морфогенетических индивидуальных особенностей.

В ходе иммуногистохимического изучения постишемической компенсаторно-восстановительной реорганизации нервной ткани гиппокампа нами выявлены два основных структурных компартмента, для которых характерны максимальные изменения. Это тонкие периферические отростки астроцитов (*GFAP*) и зоны, обеспечивающие межнейронную коммуникацию – терминали (*p38*), дендриты (*MAP-2*). Эти компартменты локализируются в нейропиле, поэтому именно в нем происходят основные структурные изменения,

связанные с приспособлением гиппокампа к новым условиям функционирования при перманентном уменьшении количества нейронов.

В ответ на мелкоочаговые реактивные и деструктивные изменения в остром периоде после 20 мин ООСА блокировалась передача импульсов и нарушалась межнейронная коммуникация энторинальной коры, гиппокампа и зубчатой извилины. Однако, параллельно включались компенсаторно-восстановительные процессы нейронной и астроглиальной сетей. Усиливалась дренажно-детоксикационная функция астроцитов, активизировалась синаптическая пластичность, обеспечивающая постоянную реорганизацию сохранившихся нейронных сетей. По нашим данным, одновременно реализовалась пластичность Хеббеса и гомеостатическая пластичность – образование и гибель синапсов.

Таким образом, для восстановления функций гиппокампа даже при относительно легкой ишемии была необходима длительная перманентная подстройка «информационной матрицы» к условиям функционирования (деструкции части нейронов) [133]. Вероятно, что функциональное восстановление гиппокампа после 20 мин ООСА происходило за счет реорганизации связей устойчивых к ишемии нейронов и сопровождалось образованием новых терминалей. Восстановление межнейронных отношений сохранившихся нейронов и их компенсаторная пространственная реорганизация обеспечивались синхронными изменениями всех клеток нейроглии. При этом роль астроглии, олигодендроглии и микроглии уточняется. Об этом свидетельствует большое количество публикаций.

Несомненно, одно – для восстановления функций гиппокампа после 20 мин ООСА было необходимо: уменьшение проявлений отека-набухания, восстановление цитоскелета нейронов, активация астроцитов, микроглиоцитов и олигодендроцитов, увеличение доли нейронов с двумя и более ядрышками, а также, как следствие, гипертрофия и образование избыточного количества синаптических терминалей с последующей их частичной элиминацией. Все это целесообразно рассматривать как условия, обеспечивающие реализацию

механизмов естественной защиты, адаптации, возможности активации нервных клеток и перестройки нейронных сетей под конкретное функционирование нейронных сетей. Поэтому любая дисфункция вышеназванных структур закономерно приведет к дисфункции гиппокампальной формации в целом. С другой стороны, выделение представленных выше необходимых условий адаптации-восстановления открывает новые перспективы для терапевтических вмешательств, которые помогут мозгу приспособиться к ишемии и адекватно повреждению восстанавливать свои функции [93; 94; 157].

Концепция естественной защиты нейронов требует дальнейшей разработки по всем возможным механизмам (указано выше) и направлениям. В последнее время особое внимание уделяется изучению механизмов защиты, связанных с функционированием микроглии [30; 93; 94]. На долю микроглии приходится 10 % от общего числа клеток в центральной нервной системе зрелого мозга. В здоровой ЦНС микроглия находится в очень активном состоянии «наблюдения и быстрого реагирования» [217].

Микроглиоциты непрерывно сканируют окружающую среду для анализа по многим параметрам состояния ткани. Они способны обнаруживать изменения pH, АТФ, содержание пуринов, цитокинов, хемокинов, аминокислот и неорганических соединений [124; 130]. Одной из главных функций микроглии является поддержание баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в интактном и поврежденном мозге. Способность микроглии к выполнению этой функции уменьшается при старении организма и накоплении скрытых повреждений клеток, которые могут состоять в эпигенетических нарушениях, посттрансляционной модификации белков и накоплении не утилизируемых продуктов жизнедеятельности клетки (амилоид, липофусцин и др.) [30].

Микроглия участвует в запрограммированной гибели нейронов, апоптозе и клиренсе новых нейронов в процессе развития. Активность микроглии способствует элиминации и созреванию синапсов [217]. Фагоцитарная активность микроглии необходима для очищения от дегенеративно измененных нейронов [30; 94]. Микроглиоциты являются клетками, которые не только поддерживают

гомеостаз ЦНС, но и реагируют на ишемическую нейродегенерацию путем пролиферации, изменения транскрипции и морфотипа (M1, M2). В зависимости от полученного стимула, этот профиль активации микроглии отличается и может привести как к негативным, так и позитивным последствиям [217].

Таким образом, перспективным направлением при изучении механизмов естественной защиты нейронов после острой ишемии является изучение нейроглии. Именно целенаправленная регуляция активности ее клеток позволит максимально полно сохранить поврежденные нейроны и перепрограммировать их на процесс восстановления. В этой связи проведенное нами исследование может послужить для понимания морфологических изменений в гиппокампе при острой ишемии легкой и средней степени тяжести.

ВЫВОДЫ

1. Нейроцито-, глиоцито-, синаптоархитектоника, ядерно-цитоплазматические и нейроглиальные отношения CA₁, CA₃, CA₄ и зубчатой извилины головного мозга белых крыс в норме статистически значимо отличались.

2. Через 1–3 сут после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий в гиппокампе отмечены проявления отека-набухания нервной ткани до 15 %, в контроле – 6 % поля зрения, доля нормохромных нейронов уменьшалась до 23–27 %, вакуолизировались, разрушались дендриты и синаптические терминали (площадь меток p38 уменьшалась до 10–15 %, контроль 20–25 %). Изменения имели диффузно-мелкоочаговые гетерохронный и гетероморфный характер, отличались между полями гиппокампа.

3. Максимальная элиминация дегенеративно измененных темных нейронов происходила в поле CA₁, общая численная плотность нейронов этого поля уменьшилась на 31 %, а в CA₃ – на 20 %. Преобладала деструкция за счет механизмов коагуляционного некроза и фагоцитоза, а иммуногистохимические проявления апоптоза выявлялись в единичных нейронах.

4. Разрушение и элиминация нейронов после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий сопровождались компенсаторно-восстановительной реорганизацией нейроглиальных комплексов и межнейронных взаимоотношений.

5. Через 3 и 7 сут после окклюзии во всех отделах активировалась пролиферация нейроглии и клеток микрососудов (Ki-67), усиливалась экспрессия GFAP, увеличивался нейроглиальный индекс (до 1,5, контроль – 0,7), появлялось большое количество клеток-сателлитов и реактивных микроглиоцитов.

6. Астроглиоз проявлялся усложнением реорганизации астроглиоархитектоники за счет разветвления мелких отростков астроцитов. В разных отделах гиппокампа эти изменения различались по степени и времени их проявления. Максимальный перепад переменных «фрактальная размерность» и «лакунарность», характеризующих долю и форму отростков в пространстве, отмечен в молекулярном слое гиппокампа.

7. В процессе восстановления межнейронных коммуникаций в постишемическом периоде уменьшались проявления отека-набухания, снижалось содержание темных нейронов, восстанавливался цитоскелет нейронов, усиливались проявления реактивного астроглиоза, увеличивалась доля нейронов с двумя и более ядрышками (до 32–44 %, контроль 15 %), образовывалось избыточное количество синаптических терминалей. Одновременно реализовывались пластичность Гейббеса и гомеостатическая пластичность.

8. Острая ишемия головного мозга стимулировала свойства проапоптотического фермента каспазы-3, связанного с механизмами нейропластичности. Содержание каспазы-3 коррелировало с $p38$ синаптических терминалей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ac	астроциты
АТП	активаторы тканевого плазминогена
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ЗИ	зубчатая извилина
ЗМЯ	зона максимальной яркости
МГЦ	микроглиоциты
НГИ	нейроглиальный индекс
ОДЦ	олигодендроциты
ООСА	окклюзия общих сонных артерий
ОСМА	окклюзия сонной мозговой артерии
ОЧПН	общая численная плотность нейронов
ПА	протоплазматические астроциты
CA ₁ , CA ₂ , CA ₃ , CA ₄	поля гиппокампа
ФА	фиброзные астроциты
ЦНС	центральная нервная система
ЭК	энторинальная кора
ЯЦО	ядерно-цитоплазматические отношения
Bcl-2	ингибитор каспаз
CASP3	каспаза 3
FD (ФР)	фрактальная размерность
GDNF	глиальный нейротрофический фактор
GFAP	кислый фибриллярный белок астроцитов
HSP	белок теплового шока
Ki-67	маркер пролиферативной активности
LTD	долгосрочная синаптическая депрессия
LTP	долговременная потенция
MAP2	белок, ассоциированный с микротрубочками 2
NSC	стволовые нейроглиальные клетки

NSE	нейрон специфическая енолаза
p38	синаптофизин
P53	проапоптотический белок
ROI	зона интереса, только нейропиль
SGL	зубчатая извилина гиппокампа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аврущенко, М. Ш. Постреанимационные изменения экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF): взаимосвязь с процессом гибели нейронов / М. Ш. Аврущенко, И. В. Острова // *Общая реаниматология*. – 2017. – Т. 13, № 4. – С. 6–21.
2. Адаптационная роль глиального нейротрофического фактора при ишемии головного мозга / Е. В. Митрошина, Б. Ж. Абогессименгане, М. Д. Уразов [и др.]. // *Современные технологии в медицине*. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 68–77.
3. Акулинин, В. А. Реакция астроцитов неокортекса человека на клиническую смерть и реперфузию / В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев // *Журнал анатомии и гистопатологии*. – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 9–17.
4. Акулинин, В. А. Особенности изменений неокортекса, архикортекса и миндалевидного тела белых крыс после острой ишемии / В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев // [и др.]. – *Журнал анатомии и гистопатологии*. – 2018. – Т. 7, № 2. – С. 9–17.
5. Ансамблевые взаимодействия в центральной нервной системе / А. В. Кузин, Ю. Г. Васильев, В. М. Чучков [и др.]. – Ижевск-Берлин : АНК, 2004. – 160 с.
6. Арушанян, Э. Б. Гиппокамп и нарушения познавательной деятельности / Э. Б. Арушанян; Э. В. Бейер // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 2007. – Т. 107, № 7. – С. 72–77.
7. Боголепова, А. Н. Современные подходы к диагностике и лечению сосудистой деменции / А. Н. Боголепова // *Эффективная фармакотерапия* – 2013 – Т. 57 – С. 12–17.
8. Бонь, Е. И. Морфологические нарушения нейронов гиппокампа крыс с субтотальной и тотальной ишемией / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин // *Оренбургский медицинский вестник*. – 2020. – Т. 8, № 2 (30). – С. 41–46.
9. Боровиков, В. П. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере /

В. П. Боровиков. – Санкт-Петербург : Питер, 2003. – 688 с.

10. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон ; пер. с англ. – Москва : Высшая школа, 1991. – 399 с.

11. Васильев, Ю. Г. Нейро-глио-сосудистые отношения в центральной нервной системе (морфологическое исследование с элементами морфометрического и математического анализа) / Ю. Г. Васильев, В. М. Чучков. – Ижевск : АНК, 2003. – 164 с.

12. Влияние ишемического посткондиционирования на экспрессию белка bcl-2 в нейронах неокортекса при глобальной ишемии- реперфузии головного мозга у крыс / Н. С. Щербак, Д. А. Овчинников, М. М. Галагудза [и др.] // Трансляционная медицина. – 2016. – Т. 3, № 1. – С. 63–72.

13. Глиоцитоархитектоника зубчатой фасции и поля СА4 гиппокампа головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий / А. В. Горбунова, Д. Б. Авдеев, С. С. Степанов [и др.] // Общая реаниматология. – 2019. – Т. 15, № 6. – С. 26–37.

14. Гусев, Е. И. Ишемический инсульт современное состояние проблемы / Е. И. Гусев, М. Ю. Мартынов, П. Р. Камчатнов // Доктор.Ру. – 2013. – № 5 (83). – С. 7–12.

15. Двухъядерные нейроны: синцитиальное слияние или амитоз / О. С. Сотников, Л. Е. Фрумкина, А. А. Лактионова [и др.]. // Успехи физиологических наук. – 2011. – Т. 42, № 4. – С. 76–89.

16. Естественные механизмы защиты головного мозга человека при хронической ишемии / А. В. Сергеев, С. С. Степанов, В. А. Акулинин, А. В. Мыщик // Общая реаниматология. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 22–32.

17. Захаров, И. И. Проблема обратимости апоптотических процессов / И. И. Захаров, М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко // Биохимия. – 2020. – Т. 85, вып. 10. – С. 1344–1360.

18. Зиматкин, С. М. Темные нейроны мозга / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Морфология. – 2017. – Т. 152, №6. – С. 81–86.

19. Зиматкин, С. М. Строение и развитие коры головного мозга крысы / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь. – Гродно : ГрГМУ, 2019. – 156 с.
20. Иммуногистохимическая характеристика структур коммуникации нейронов коры головного мозга человека в норме и после реперфузии / А. С. Степанов, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, А. В. Мыщик // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2016. – Т. 5, № 4. – С. 61–68.
21. Инсульт : руководство для врачей / под ред. Л. В. Стаховской, С. В. Котова. – М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2013. – 400 с.
22. Инсульт. Принципы диагностики, лечения и профилактики / Н. В. Верещагин, М. А. Пирадов, З. А. Суслина [и др.]. – Москва, 2002. – 208 с.
23. Ишемическое и фармакологическое прекондиционирование (часть 1) / В. В. Лихванцев, В. В. Мороз, О. А. Гребенчиков [и др.] // Общая реаниматология. – 2011. – Т. 7, № 6. – С. 59–65.
24. Ишемическое и фармакологическое прекондиционирование (часть 2) / В. В. Лихванцев, В. В. Мороз, О. А. Гребенчиков [и др.]. // Общая реаниматология. – 2012. – Т. 8, № 1. – С. 61–67.
25. Калинина, Ю. А. Астроциты и их участие в механизмах терапевтического действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга / Ю. А. Калинина, Е. Г. Гилерович, Д. Э. Коржевский // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14, № 1. – С. 33–40.
26. Клеточные системы восстановления и утилизации поврежденных нейронов головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий / А. С. Степанов, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2017. – Том. 103, № 10. – С. 1135–1147.
27. Коржевский, Д. Э. Появление звездчатых гладких миоцитов в головном мозгу крысы после транзиторной фокальной ишемии / Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, Т. Д. Власов // Морфология. – 2013. – Т. 143, № 1. – С. 73–75.
28. Корпачев, В. Г. Моделирование клинической смерти и

постреанимационной болезни у крыс / В. Г. Корпачев, С. П. Лысенков, Л. З. Тель // Патологическая физиология и экспериментальная терапия – 1982. – Т. 26, № 3. – С. 78–80.

29. Максимович, Н. Е. Белки теплового шока. Свойства. Роль в адаптации. Методические подходы к определению / Н. Е. Максимович, Е. И. Бонь // Биомедицина. – 2020. – Т. 16, № 2. – С. 60–67.

30. Микроглия головного мозга: происхождение, структура и функции / О. С. Алексеева, О. В. Кирик, Е. Г. Гилерович, Д. Э. Коржевский // Эволюционной биохимии и физиологии. – 2019. – Т. 55, № 4. – С. 231–241.

31. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 1 / Е. В. Шляхто, Е. Р. Баранцевич, Н. С. Щербак, М. М. Галагудза // Вестник РАМН. – 2012(а). – № 6. – С. 42–50.

32. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 2 / Е. В. Шляхто, Е. Р. Баранцевич, Н. С. Щербак, М. М. Галагудза // Вестник РАМН. – 2012 (б). – № 7. – С. 20–29.

33. Морфологические изменения в тканях головного мозга при экспериментальной ишемии / М. М. Шертаев, У. К. Ибрагимов, С. Х. Икрамова [и др.] // Вестник НГПУ. – 2015. – Т. 1, № 23. – С. 72–79.

34. Морфофункциональная характеристика гиппокампа белых крыс в остром периоде после тяжелой черепно-мозговой травмы на фоне применения L-лизина эсцината / И. П. Кошман, А. Ю. Шоронова, С. С. Степанов [и др.] // Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н. В. Склифосовского. – 2020. – Т. 9, № 4. – С. 529–538.

35. Морфофункциональная характеристика отека-набухания коры головного мозга белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы без и на фоне применения L-лизина эсцината / И. П. Кошман, С. С. Степанов, А. Ю. Шоронова [и др.] // Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н. В. Склифосовского. – 2020 – Т. 9, № 2. – С. 251–258.

36. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии / А. С. Степанов, В. А. Акулинин, А. В. Мыщик [и др.]. // Общая

реаниматология. – 2017. – Т. 13, № 6. – С. 6–17.

37. Оленев, С. Н. Конструкция мозга / С. Н. Оленев. – Ленинград : Медицина : Ленинград. отделение, 1987. – 206 с.

38. Острова, И. В. Экспрессия мозгового нейротрофического фактора (BDNF) повышает устойчивость нейронов к гибели в постреанимационном периоде / И. В. Острова, М. Ш. Аврущенко // Общая реаниматология. – 2015. – Т. 11, № 3. – С. 45–53.

39. Оценка неврологического статуса домашних и лабораторных животных / Ю. Г. Васильев, И. А. Вольхин, Т. Г. Данилова, Д. С. Берестов // Международный вестник ветеринарии – 2013. – № 3. – С. 52–55.

40. Пальцын, А. А. О регенерации мозга (лекция II) / А. А. Пальцын, Н. Б. Свиридкина // Патогенез. – 2018. – Т. 16, № 1. – С. 83–91.

41. Плейотропные ферменты апоптоза и синаптическая пластичность гиппокампа белых крыс после окклюзии общих сонных артерий / Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин, А. С. Степанов [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2018. – № 3 (33). – С. 102–110.

42. Реорганизация астроцитов гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий / Д. Б. Авдеев, С. С. Степанов, В. А. Акулинин [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – Т. 63, № 4. – С. 13–22.

43. Сахарнова, Т. А. Нейротрофический фактор головного мозга (bdnf) и его роль в функционировании центральной нервной системы / Т. А. Сахарнова, М. В. Ведунова, И. В. Мухина // Нейрохимия. – 2012. – Т. 29, № 4. – С. 269–277.

44. Семченко, В. В. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). 2-е издание / В. В. Семченко, С. С. Степанов, Н. Н. Боголепов. – Москва, 2014. – 499 с.

45. Семченко, В. В. Структурно-функциональное восстановление нервной ткани головного мозга в постишемическом периоде с позиций представления о провизорности в репаративном гистогенезе / В. В. Семченко, С. С. Степанов, С. И. Ерениев // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2016. – № 298. –

С. 98–102.

46. Скворцова, В. И. Ишемический инсульт / В. И. Скворцова, М. А. Евзельман. – Орел, 2006. – 296 с.

47. Слияние нейронов мозга у эмбрионов крыс / О. С. Сотников, Л. Е. Фрумкина, С. А. Новаковская, Н. Н. Боголепов // Морфология. – 2011. – Т. 139, № 2. – С. 18–21.

48. Сотников, О. С. Концепция ретикулярной организации нервной ткани Александра Догеля / О. С. Сотников, И. И. Марков // Морфологические ведомости. – 2018. – Т. 26, № 1. – С. 8–19.

49. Сравнительная характеристика структурно-функциональных изменения поля СА3 гиппокампа после острой ишемии и травмы головного мозга белых крыс / А. В. Горбунова, И. П. Кошман, А. Ю. Шоронова [и др.] // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2020. – Т. 9, № 4. – С. 19–30.

50. Сравнительные аспекты структурной организации астроцитов первого слоя коры головного мозга человека и крысы / Е. Г. Сухорукова, О. С. Алексеева, О. Б. Кирик [и др.]. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 280–286

51. Степанов, А. С. Сравнительная характеристика синаптоархитектоники неокортекса, гиппокампа и миндалевидного тела белых крыс в норме и после острой ишемии / А. С. Степанов // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2017. – Т. 6, № 4. – С. 47–54.

52. Структурная и функциональная гетерогенность астроцитов головного мозга: роль в нейродегенерации и нейровоспалении / А. В. Моргун, Н. А. Малиновская, Ю. К. Комлева [и др.]. // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 138–148.

53. Структурно-функциональная реорганизация ядрышкового аппарата нейронов неокортекса, архикортекса и базальных ганглиев головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий / С. С. Степанов, В. А. Акулинин, Д. Б. Авдеев [и др.]. // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2018. – Т. 7 (4). – С. 67–74.

54. Трушель, Н. А. Сравнительная характеристика строения сосудов виллизиева круга головного мозга у человека и лабораторных животных / Н. А. Трушель // Военная медицина. – 2009. – № 2. – С. 47–51.

55. Туманский, В. А. Апоптоз и селективный некроз нейронов ЦНС после клинической смерти и церебральной ишемии: молекулярные механизмы и морфологические особенности / В. А. Туманский, А. В. Евсеев, Ю. Ф. Полковников // Патология. – 2008. – Т. 5, № 2. – С. 19–28.

56. Тучина, О. П. Региональная гетерогенность астроцитов в отношении экспрессии глиального фибриллярного кислого белка и синтетазы глутаминa *in vitro* / О. П. Тучина, С. С. Адамовская // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 2. – С. 158.

57. Хаспеков, Л. Г. Молекулярные механизмы, опосредующие участие глиальных клеток в пластических перестройках головного мозга при эпилепсии / Л. Г. Хаспеков, Л. Е. Фрумкина // Биохимия. – 2017. – Т. 82, № 3. – С. 528–541.

58. Щербак, Н. С. Эффекты и механизмы ишемического прекондиционирования и посткондиционирования головного мозга : специальность 03.03.01 «Физиология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Щербак Наталия Сергеевна ; Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова. – Санкт-Петербург, 2016. – 51 с. : ил. – Библиогр.: с. 45–50. – Место защиты: Санкт-Петербургский государственный университет. – Текст : непосредственный.

59. Юшков, Б. Г. Клетки иммунной системы и регуляция регенерации / Б. Г. Юшков // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 94–105.

60. Яковлев, А. А. Плейотропные функции протеиназ мозга: методические подходы к исследованию и поиск субстратов каспазы / А. А. Яковлев, Н. В. Гуляева // Биохимия. – 2011. – Т. 76, № 10. – С. 1325–1334.

61. Яковлев, А. А. Прекондиционирование клеток мозга к патологическим воздействиям: вовлеченность протеаз (обзор) / А. А. Яковлев, Н. В. Гуляева // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 2. – С. 204–213.

62. A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death / G. Sun, E. Guzman, V. Balasanyan [et al.] // *J Cell Biol.* – 2017. – Vol. 216, № 10. – P. 3355–3368.
63. Abbott, N. J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier / N. J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson *Nat Rev Neurosci.* – 2006. – Vol. 7, № 1. – P. 41–53.
64. Ahmadpour, S. Dark Neurons: A protective mechanism or a mode of death / S. Ahmadpour, A. Behrad, I. Fernández-Vega // *Journal of Medical Histology.* – 2019. – Vol. 3, № 2. – P. 125–131
65. Alawieh, A. Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice / A. Alawieh, E. F. Langley, S. Tomlinson // *Sci. Transl. Med.* – 2018. – Vol. 10, № 441. – P. 6459.
66. An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion / A. S. Pagnussat, M. C. Faccioni-Heuser, C. A. Netto, M. Achaval // *J Anat.* – 2007. – Vol. 211. – P. 589–599.
67. Anderson, M. A. Heterogeneity of reactive astrocytes / M. A. Anderson, Y. Ao, M. V. Sofroniew // *Neurosci Lett.* – 2014. – Vol. 565. – P. 23–29.
68. Angiogenesis as an adaptive mechanism in ischemia / M. G. Shurygin, I. A. Shurygina, N. N. Dremina [et al.] // *Bulletin of ESSC SB RAMS.* – 2013. – Vol. 5. – P. 192–195.
69. Apoptosis in the adult striatum after transient forebrain ischemia and the effects of ischemic severity / Y. W. Ruan, G. Y. Ling, J. L. Zhang, Z. C. Xu // *Brain Res.* – 2003. – Vol. 982. – P. 228–240.
70. Are neurons multifractals? / E. Fernandez, J. A. Boleaa, G. Ortegab [et al.] // *J. Neurosci. Methods.* – 1999. – Vol. 89. – P. 151–157.
71. Astrocyte activation and capillary remodeling in a modified bilateral common carotid artery occlusion mice / J. Song, D. Nan, Q. He [et al.] // *Microcirculation.* – 2017. DOI: 10.1111/micc.12366.
72. Astrocytes contribute to the neuronal recovery promoted by high-frequency

repetitive magnetic stimulation in in vitro models of ischemia / C. Roque, N. Pinto, M. Vaz Patto, G. Baltazar // *J Neurosci Res.* – 2021. – Vol. 99, № 5. – P. 1414–1432.

73. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus / B. Seri, M. G. 'a-Verdugo, B. S. McEwen, A. Alvarez-Buylla // *The Journal of Neuroscience.* – 2001. – Vol. 21, № 18. – P. 7153–7160.

74. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles / A. Mishra, J. P. Reynolds, Y. Chen [et al.] // *Nat. Neurosci.* – 2016 – Vol. 19, № 12. – P. 1619–1627.

75. Astrocytes react to oligemia in the forebrain induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats / R. Schmidt-Kastner, C. Aguirre-Chen, I. Saul [et al.] // *Brain Res.* – 2005. – Vol. 1052. – P. 28–39.

76. Astrocytes: Targets for Neuroprotection in Stroke / G. Barreto, R. E. White, Y. Ouyang [et al.] // *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* – 2011. – Vol. 11, № 2. – P. 164–173.

77. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus / C. R. Rose, L. Felix, A. Zeug [et al.] // *Front Mol Neurosci.* – 2018. – Vol. 10, № 451. – P. 1–20.

78. Autophagy-physiology and pathophysiology / Y. Uchiyama, M. Shibata, M. Koike [et al.] // *Histochem Cell Biol.* – 2008. – Vol. 129, № 4. – P. 407–420.

79. Baltan, S. Age-specific localization of NMDA receptors on oligodendrocytes dictates axon function recovery after ischemia / S. Baltan // *Neuropharmacology.* – 2016. – Vol. 110. – P. 626–632.

80. BDNF Overexpression Enhances the preconditioning effect of brief episodes of hypoxia, promoting survival of GABAergic neurons / M. V. Turovskaya, S. G. Gaidin, M. V. Vedunova [et al.] // *Neurosci Bull.* – 2020. – Vol. 36, № 7. – P. 733–760.

81. Best practices approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing – for Today / B. Bolon, R. Garman, K. Jensen [et al.] // *Toxicologic Pathology.* – 2006. – Vol. 34. – P. 296–313.

82. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke / X. Jiang, A. V. Andjelkovic, L. Zhu [et al.] // *Prog Neurobiol.* – 2018. – Vol. 163-164. –

P. 144–171.

83. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex / H. Wolburg, S. Noell, A. Mack [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2009. – Vol. 335, № 1. – P. 75–96.

84. Brain ischemia in patients with intracranial hemorrhage: pathophysiological reasoning for aggressive diagnostic management / D. Naranjo, M. Arkuszewski, W. Rudzinski [et al.] // *Neuroradiol J.* – 2013. – Vol. 26, № 6. – P. 610–628.

85. Busija, D. W. Mitochondrial mechanisms in cerebral vascular control: shared signaling pathways with preconditioning / D. W. Busija, P. V. Katakam // *J Vasc Res.* – 2014. – Vol. 51, № 3. – P. 175–189.

86. Calabresi, P. Post-ischaemic long-term synaptic potentiation in the striatum: a putative mechanism for cell type-specific vulnerability / P. Calabresi, E. Saulle, D. Centonze // *Brain.* – 2002. – Vol. 125, № 4. – P. 844–860.

87. Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia / C. Thornton, B. Leaw, C. Mallard [et al.] // *Front. Cell. Neurosci.* – 2017 – Vol. 11 – P. 248.

88. Cell fusion along the anterior-posterior neuroaxis in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis / S. R. Sankavaram, M. A. Svensson, T. Olsson [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 7. – P. 1–15.

89. Cell type-specific mechanisms in the pathogenesis of ischemic stroke: The role of apoptosis signal-regulating kinase 1 / S. Y. Cheon, E. J. Kim, J. M. Kim [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – Article ID 2596043 – P. 1–9.

90. Cembrowski, M. S. Heterogeneity within classical cell types is the rule: lessons from hippocampal pyramidal neurons / M. S. Cembrowski, N. Spruston // *Nat Rev Neurosci.* – 2019. – Vol. 20, № 4. – P. 193–204.

91. Changes in the constant potential in brain structures in rats during focal ischemia and systemic hypoxia / Ya. Buresh, V. I. Koroleva, O. S. Korolev, V. Maresh // *Neuroscience and behavioral physiology* – 1999. – Vol. 29, № 5. – P. 569–579.

92. Chen, S. D. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia / S. D. Chen, D. I. Yang, T. K. Lin [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2011. – Vol. 12, № 10. – P. 7199–7215.

93. Chen, Z. Microglia and neuroprotection / Z. Chen, B. D. Trapp // *J Neurochem.* – 2016. – Vol. 136, Suppl 1. – P. 10–17.
94. Chen, Z. The role of microglia in viral encephalitis: a review / Z. Chen, D. Zhong, G. Li // *Journal of Neuroinflammation.* – 2019. – Vol. 16. – P. 76.
95. Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance / C. Liston, J. M. Cichon, F. Jeanneteau [et al.] // *Nat Neurosci.* – 2013. – Vol. 16. – P. 698–705.
96. Cognitive impairment after traumatic brain injury is associated with reduced long-term depression of excitatory postsynaptic potential in the rat hippocampal dentate gyrus / B. L. Zhang, Y. S. Fan, J. W. Wang [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2018. – Vol. 13, № 10. – P. 1753–1758.
97. Collateral circulation in acute stroke: assessing methods and impact: a literature review / E. Martinon, P. H. Lefevre, P. Thouant [et al.] // *J Neuroradiol.* – 2014. – Vol. 41, № 2. – P. 97–107.
98. Conversion of reactive astrocytes to induced neurons enhances neuronal repair and functional recovery after ischemic stroke / M. Q. Jiang, S. P. Yu, Z. Z. Wei [et al.] // *Front. Aging Neurosci.* – 2021. – Vol. 2. – P. 612856.
99. Cooper, C. On the run for hippocampal plasticity / C. Cooper, H. Y. Moon, H. van Praag // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2018. – Vol. 8, № 4. – P. 1–30.
100. Cowan, M. Microglia: Immune regulators of neurodevelopment / M. Cowan, W. A. Petri Jr. // *Frontiers in immunology.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2576.
101. Damisah, E. C. Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal in vivo / E. C. Damisah, R. A. Hill, A. Rai // *Science Advances.* – 2020. – Vol. 6, № 26. – P. 3239.
102. De Pittà, M. Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? / M. De Pittà, N. Brunel, A. Volterra // *Neuroscience.* – 2016. – Vol. 323. – P. 43–61.
103. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans / K. L. Spalding, O. Bergmann, K. Alkass [et al.] // *Cell.* – 2013. – Vol. 153, № 6. – P. 1219–1227.
104. Excitotoxic versus apoptotic mechanisms of neuronal cell death in perinatal hypoxia/ischemia / C. Young, T. Tenkova, K. Dikranian, J. W. Olney // *Curr Mol Med.* –

2004. – Vol. 4, № 2. – P. 77–85.

105. Express reveals widespread and diverse patterns of cell survival of caspase-3 activation during development in vivo / A. X. Ding, G. Sun., Y. G. Argaw [et al.] // *Elife*. – 2016. – Vol. 8, № 5. – P. e10936.

106. Eyo, U. B. Microglia: Key Elements in Neural Development, Plasticity, and Pathology / U. B. Eyo, M. E. Dailey // *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. – 2013 – Vol. 8. – P. 494–509.

107. Ferriero, D. M. Imaging selective vulnerability in the developing nervous system / D. M. Ferriero, S. P. Miller // *J. Anat.* – 2010. – Vol. 217. – P. 429–435.

108. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia / D. Pirici, L. Mogoantă, O. Mărgăritescu [et al.] // *Rom J Morphol Embryol*. – 2009. – Vol. 50, № 3. – P. 381–390.

109. From Cell Death to Neuronal Regeneration: Building a New Brain after Traumatic Brain Injury / N. C. Royo, J. W. Schouten, C. T. Fulp [et al.] // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 2003. – Vol. 62, № 8. – P. 801–811.

110. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia / H. Zhao, C. Ren, X. Chen, J. Shen // *Curr Drug Targets*. – 2012. – Vol. 13. – P.173–187.

111. Frost, J. L. Architects of the developing nervous System / J. L. Frost, D. P. Schafer // *Trends Cell Biol*. – 2016. – Vol. 26. – P. 587–597.

112. Furusawa, K. Scrap and build for functional neural circuits: spatiotemporal regulation of dendrite degeneration and regeneration in neural development and disease / K. Furusawa, K. Emoto // *Front Cell Neurosci*. – 2021. – Vol. 14. – P. 613320.

113. Fusogen-mediated neuron-neuron fusion disrupts neural circuit connectivity and alters animal behavior / R. Giordano-Santinia, E. Kaulicha, K. M. Galbraitha [et al.] // *PNAS*. – 2020. – Vol. 117, № 37. – P. 23054–23065.

114. Gallyas, F. Supravital microwave experiments support that the formation of “dark” neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system / F. Gallyas, J. Pál, P. Bukovics // *Brain Research*. – 2009. – Vol. 1270. – P. 152–156.

115. Garman, R. H. Histology of the central nervous system / R. H. Garman //

Toxicologic Pathology. – 2011. – Vol. 39. – P. 22–35.

116. Giordano-Santini, R. Cell-cell fusion in the nervous system: Alternative mechanisms of development, injury, and repair / R. Giordano-Santini, C. Linton, M. A. Hilliard // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2016. – Vol. 60. – P. 146–154.

117. Glial Cells and Integrity of the Nervous System / R. von Bernhardi, J. Eugénin-von Bernhardi, B. Flores, J. Eugénin León // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2016. – Vol. 949. – P. 1–24.

118. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke / S. Xu, J. Lu, A. Shao, J. Zhang // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 294.

119. Glia-neuron interactions in the mammalian retina / E. Vecino, F. D. Rodriguez, N. Ruzafa [et al.] // *Prog Retin Eye Res.* – 2016. – Vol. 51. – P. 1–40.

120. Global brain inflammation in stroke / K. Shi, D. C. Tian, Z. G. Li [et al.] // *Lancet Neurol.* – 2019. – Vol. 18, № 11. – P. 1058–1066.

121. Global brain ischemia in Mongolian gerbils: Assessing the level of anastomosis in the cerebral circle of Willis / N. S. Martínez, J. M. Machado, H. P. Saad [et al.] // *Acta Neurobiol Exp.* – 2012. – Vol. 72. – P. 377–384.

122. Goryacheva Intermittent hypoxia stimulates formation of binuclear neurons in brain cortex – A role of cell fusion in neuroprotection? / A. A. Paltsyn, E. B. Manukhina, A. V. Goryacheva [et al.] // *Experimental Biology and Medicine.* – 2014. – Vol. 239. – P. 595–600.

123. Granger, D. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept / D. Granger, P. Kvietys // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 524–551.

124. Greter, M. Regulation of microglia development and homeostasis / M. Greter, M. Merad // *Glia.* – 2013. – Vol. 61. – P. 121–127.

125. Gu, Y. Neurogenesis and hippocampal plasticity in adult brain / Y. Gu, S. Janoschka, S. Ge // *Curr Top Behav Neurosci.* – 2013 – Vol. 15. – P. 31–48.

126. Hanisch, U. K. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain / U. K. Hanisch, H. Kettenmann // *Nat. Neurosci.* – 2007. – Vol. 10, № 11. – P. 1387–1394.

127. Hara, Y. Brain plasticity and rehabilitation in stroke patients / Y. Hara // *J*

Nippon Med Sch. – 2015. – Vol. 82, № 1. – P. 4–13.

128. Harris, T. C. The Shrinking Brain: Cerebral Atrophy Following Traumatic Brain Injury / T. C. Harris, R. de Rooij, E. Kuhl // *Ann Biomed Eng.* – 2019. – Vol. 47, № 9. – P. 1941–1959.

129. Hawkins, B. T. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease / B. T. Hawkins, T. P. Davis // *Pharmacol Rev.* – 2005. – Vol. 57, № 2. – P. 173–185.

130. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration / M. Prinz, J. Priller, S. S. Sisodia, R. M. Ransohoff // *Nat Neurosci.* – 2011. – Vol. 14. – P. 1227–1235.

131. Hewett, J. A. Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system / J. A. Hewett // *J Neurochem.* – 2009 – Vol. 110, № 6 – P. 1717–36.

132. Hippocampal damage in the human brain after cardiac arrest / M. Fujioka, K. Nishio, S. Miyamoto [et al.] // *Cerebrovasc Dis.* – 2000. – Vol. 10. – P. 2–7.

133. Hobbiss, A. F. Homeostatic plasticity scales dendritic spine volumes and changes the threshold and specificity of hebbian plasticity / A. F. Hobbiss, Y. Ramiro-Corte's, I. Israely // *iScience.* – 2018. – Vol. 8. – P. 161–174.

134. Holmes, G. L. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic / G. L. Holmes // *Epilepsia* – 1997. – Vol. 38. – P. 12–30.

135. Hong, H. The role of macrophages in vascular repair and regeneration after ischemic injury / H. Hong, X. Y. Tian // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 17 – P. 6328.

136. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions / G. Kempermann, F. H. Gage, L. Aigner [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2018. – Vol. 23, № 1. – P. 25–30.

137. Hypothalamic, thalamic and hippocampal lesions in the mouse MCAO model: Potential involvement of deep cerebral arteries? / M. E. Amki, T. Clavier, N. Perzo [et al.] // *J. Neurosci. Methods* – 2015. – Vol. 254. – P. 80–85.

138. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex / L. Lyck, I. Dalmau, J. Chemnitz [et al.] // *Journal of*

Histochemistry & Cytochemistry. – 2008. – Vol. 56, № 3. – P. 201–221.

139. Inflammatory Responses in the Secondary Thalamic Injury After Cortical Ischemic Stroke / Z. Cao, S. S. Harvey, T. M. Bliss [et al.] // *Front Neurol.* – 2020. – Vol. 11, № 236. – P. 1–12.

140. Ischemia leads to apoptosis-and necrosis-like neuron death in the ischemic rat hippocampus / G. J. Muller, C. Stadelmann, L. Bastholm [et al.] // *Brain Pathol.* – 2004. – Vol. 14, № 4. – P. 415–424.

141. Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells / D. B. Kirdajova, J. Kriska, J. Tureckova [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2020. – Vol. 14. – P. 51.

142. Ischemic postconditioning may not influence early brain injury induced by focal cerebral ischemia/reperfusion in rats / Y. K. Kim, J. G. Leem, J. W. Shin [et al.] // *Korean J Anesthesiol.* – 2010. – Vol. 58, № 2. – P. 176–183.

143. Jordan, J. Mitochondria: the headquarters in ischemia-induced neuronal death / J. Jordan, P. W. de Groot, M. F. Galindo // *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* – 2011. – Vol. 11, № 2. – P. 98–106.

144. Jortner, B. S. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation / B. S. Jortner // *Neurotoxicology.* – 2006. – Vol. 27, № 4. – P. 628–634.

145. Karperien, A. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis / A. Karperien, H. Ahammer, H. F. Jelinek // *Front. Cell. Neurosci.* – 2013 – Vol. 7, № 3 – P. 1–18.

146. Kawabori, M. Inflammatory responses in brain ischemia / M. Kawabori, M. A. Yenari // *Curr. Med. Chem.* – 2015 – Vol. 22, № 10 – P. 1258–1277.

147. Kernie, S. G. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury / S. G. Kernie, J. M. Parent // *Neurobiol Dis.* – 2010. – Vol. 37, № 2. – P. 267–274.

148. Kim, E. J. Stress effects on the hippocampus: a critical review / E. J. Kim, B. Pellman, J. J. Kim // *Learn Mem.* – 2015. – Vol. 22, № 9. – P. 411–416.

149. Kirino, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following

ischemia / T. Kirino // *Brain Res.* – 1982. – Vol. 239. – P. 57–69.

150. Koizumi, S. New roles of reactive astrocytes in the brain; an organizer of cerebral ischemia / S. Koizumi, Y. Hirayama, Y. M. Morizawa // *Neurochem Int.* – 2018. – Vol. 119. – P. 107–114.

151. Kövesdi, E. The fate of "dark" neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: neurobiological aspects / E. Kövesdi, J. Pál, F. Gallyas // *Brain Res.* – 2007. – Vol. 1147. – P. 272–283.

152. Kravtsov, V. The fusogen AFF-1 can rejuvenate the regenerative potential of adult dendritic trees by self-fusion / V. Kravtsov, M. Oren-Suissa, B. Podbilewicz // *Development.* – 2017. – Vol. 144, № 13. – P. 2364–2374.

153. Lana, D. An overview on the differential interplay among neurons-astrocytes-microglia in ca1 and CA3 hippocampus in hypoxia/ischemia / D. Lana, F. Ugolini, M. G. Giovannini // *Front Cell Neurosci.* – 2020. – Vol. 14, № 585833 – P. 1–23.

154. Lapi, D. Remodeling of cerebral microcirculation after ischemia-reperfusion / D. Lapi, A. Colantuoni // *J Vasc Res.* – 2015. – Vol. 52, № 1. – P. 22–31.

155. Liang, Z. The multifaceted role of astrocyte connexin 43 in ischemic stroke through forming hemichannels and gap junctions / Z. Liang, X. Wang, Y. Hao // *Front Neurol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 703.

156. Liddelow, S. A. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential / S. A. Liddelow, B. A. Barres // *Immunity.* – 2017. – Vol. 46. – P. 957–967.

157. Lifecourse health development: past, present and future / N. Halfon, K. Larson, M. Lu [et al.] // *Matern Child Health J.* – 2014. – Vol. 18. – P. 344–365.

158. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons / P. Lipton // *Physiological reviews.* – 1999. – Vol. 79, №. 4. – P. 1431–1568.

159. Liston, C. Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo / C. Liston, W. B. Gan // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2011. – Vol.108. – P. 16074–16079.

160. Liu, F. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential / F. Liu, L. D. McCullough // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* –

2011. – Vol. 2011. – P. 1–9.

161. Liu, F. TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion / F. Liu, D. P. Schafer, D. McCullough // *J Neurosci Methods*. – 2009. – Vol. 179. – P. 1–8.

162. Loss of immunohistochemical reactivity in association with handling-induced dark neurons in mouse brains / V. Soontornniyomkij, R. C. Chang, B. Soontornniyomkij [et al.] // *Toxicol Pathol*. – 2020. – Vol. 48, № 3. – P. 437–445.

163. Lychko, V. S. Morphological changes of the brain tissue in rats with experimental model of ischemic stroke in the dynamics of treatment by immunobiological preparation cryocell-cryocord / V. S. Lychko, V. A. Malakhov, A. A. Potapov // *CTM*. – 2015. – Vol. 7, № 4. – P. 58–62.

164. M2 microglial small extracellular vesicles reduce glial scar formation *via* the miR-124/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice / Z. Li, Y. Song, T. He [et al.] // *Theranostics*. – 2021 – Vol. 11, № 3 – P. 1232–1248.

165. Mark, K. S. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation / K. S. Mark, T. P. Davis // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2002 – Vol. 282 – P. 1485–1494.

166. Markram, H. Seven challenges for neuroscience / H. Markram // *Funct. Neurol.* – 2013 – Vol. 28, № 3 – P. 145–151.

167. Marsden, W. N. Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates / W. N. Marsden // *Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2013. – Vol. 43. – P. 168–184.

168. Martin, L. J. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases / L. J. Martin // *Prog Mol Biol Transl Sci*. – 2012. – Vol. 107. – P. 355–415.

169. Martone, M. E. Alterations of hippocampal postsynaptic densities following transient ischemia / M. E. Martone, B. R. Hu, M. H. Ellisman // *Hippocampus*. – 2000. – Vol. 10, № 5. – P. 610–616.

170. Maurer, L. L. The mechanisms of neurotoxicity and the selective vulnerability of nervous system sites / L. L. Maurer, M. A. Philbert // *Handb Clin Neurol*. – 2015. – Vol. 131. – P. 61–70.

171. McDonough, A. The role of microglia in ischemic preconditioning / A. McDonough, J. R. Weinstein // *Glia*. – 2020. – Vol. 68, № 3. – P. 455–471.
172. McEwen, B. S. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex / B. S. McEwen, C. Nasca, J. D. Gray // *Neuropsychopharmacology*. – 2016. – Vol. 41, № 1. – P. 3–23.
173. McEwen, B. S. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex / B. S. McEwen, C. Nasca, J. D. Gray // *Neuropsychopharmacology reviews*. – 2016. – Vol. 41. – P. 3–23.
174. Mechanisms of astrocyte-mediated cerebral edema / J. A. Stokum, D. B. Kurland, V. Gerzanich [et al.] // *Neurochem. Res.* – 2015. – Vol. 40, № 2. – P. 317–328.
175. Mechanisms of cell-cell interaction in oligodendrogenesis and remyelination after stroke / K. Itoh, T. Maki, J. Lok, K. Arai // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 14, № 1623. – P. 135–149.
176. Mechanisms of perinatal arterial ischemic stroke / D. Fernández-López, N. Natarajan, S. Ashwal, Z. S. Vexler // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2014. – Vol. 34, № 6. – P. 921–932.
177. Merino, J. G. Imaging of acute stroke / J. G. Merino, S. Warach // *Nat. Rev. Neurol.* – 2010. – Vol. 6, № 10. – P. 560–571.
178. Microglia provide neuroprotection after ischemia / J. Neumann, M. Gunzer, H. O. Gutzeit [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, № 6. – P. 714–716.
179. Morgan, B. P. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases / B. P. Morgan, C. L. Harris // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2015. – Vol. 14. – P. 857–877.
180. Morphological and functional alterations of astrocytes responding to traumatic brain injury / X. Cheng, J. Wang, X. Sun [et al.] // *J. Integr. Neurosci.* – 2019. – Vol. 18, № 2. – P. 203–215.
181. Moser, E. I. Spatial representation in the hippocampal formation: a history / E. I. Moser, M. B. Moser, B. L. McNaughton // *Nat. Neurosci.* – 2017. – Vol. 20, № 11. – P. 1448–1464.

182. Nanoconnectomic upper bound on the variability of synaptic plasticity / T. M. Bartol, C. Bromer, J. Kinney, M. A. Chirillo [et al.] // *eLife*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1–18.
183. Navidhamidi, M. Epilepsy-associated alterations in hippocampal excitability / M. Navidhamidi, M. Ghasemi, N. Mehranfard // *Rev Neurosci*. – 2017. – Vol. 28, № 3. – P. 307–334.
184. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here / M. K. Tobin, J. A. Bonds, R. D. Minshall [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2014. – Vol. 34, № 10. – P. 1573–1584.
185. Neuroplasticity in stroke recovery. The role of microglia in engaging and modifying synapses and networks / I. Sandvig, I. L. Augestad, A. K. Håberg, A. Sandvig // *Eur J Neurosci*. – 2018. – Vol. 47, № 12. – P. 1414–1428.
186. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia / S. A. Liddelow, K. A. Guttenplan, L. E. Clarke [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 541. – P. 481–487.
187. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury / D-C. Wagner, J. Scheibe, I. Glocke [et al.] // *Acta neurobiologiae experimentalis*. – 2013. – Vol. 73, № 1. – P. 79–87.
188. Opitz, B. Memory function and the hippocampus / B. Opitz // *Front Neurol Neurosci*. – 2014. – Vol. 34. – P. 51–59.
189. Oxidative stress in hypoxic-ischemic encephalopathy: molecular mechanisms and therapeutic strategies / M. Zhao, P. Zhu, M. Fujino [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2016. – Vol. 17, № 12. – P. 1–14.
190. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection / H. Chen, H. Yoshioka, G. S. Kim [et al.] // *Antioxidants & redox signaling*. – 2011. – Vol. 14, № 8. – P. 1505–1517.
191. Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture / A. Almeida, M. Delgado-Esteban, J. P. Bolanos [et al.] // *J. Neurochem*. – 2002. – Vol. 81, № 2. – P. 207–217.

192. Paizanis, E. Hippocampal neurogenesis, depressive disorders, and antidepressant therapy / E. Paizanis, M. Hamon, L. Lanfumeu // *Neural Plast.* – 2007. – Vol. 2007. – P. 1–7

193. Panickar, K. S. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations / K. S. Panickar, M. D. Norenberg // *Glia.* – 2005. – Vol. 50, № 4. – P. 287–298.

194. Park, K. Neuronal adhesion and synapse organization in recovery after brain injury / K. Park, T. Biederer // *Future Neurology.* – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. 555–567.

195. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke / S. E. Khoshnam, W. Winlow, M. Farzaneh [et al.] // *Neurological Sciences.* – 2017. – Vol. 38, № 7. – P. 1167–1186.

196. Pathological changes in microvascular morphology, density, size and responses following comorbid cerebral injury / Z. Amtul, J. Yang, T.-Y. Lee, D. F. Cechetto // *Front. Aging Neurosci.* – 2019. – Vol. 11. – P. 47.

197. Paxinos, G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* / G. Paxinos, C. Watson // 5th ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. – 2005. – P. 367

198. Pekny, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits / M. Pekny, M. Pekna // *Physiol Rev.* – 2014. – Vol. 94. – P. 1077–1098.

199. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells / S. Nakagawa, M. A. Deli, S. Nakao [et al.] // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2007. – Vol. 27, № 6. – P. 687–694.

200. Perspectives in neonatal and childhood arterial ischemic stroke / J. Fluss, M. Dinomais, M. Kossorotoff [et al.] // *Expert. Rev. Neurother.* – 2017 – Vol. 17, № 2 – P. 135–142.

201. Plasticity of microglia in remote regions after focal brain injury / E. Bisicchia, V. Sasso, M. Molinari, M. T. Viscomi // *Semin Cell Dev Biol.* – 2019. – Vol. 94. – P. 104–111.

202. Post-stroke remodeling processes in animal models and humans / C. Cirillo, N. Brihmat, E. Castel-Lacanal [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2020. –

Vol. 40, № 1. – P. 3–22.

203. Precise cerebral vascular atlas in stereotaxic coordinates of whole mouse brain / B. Xiong, A. Li, Y. Lou [et al.]// *Front. Neuroanat.* – 2017. – Vol. 11, № 128. – P. 1–17

204. Preparation and analysis of the central nervous system / W. H. Jordan, J. K. Young, M. J. Hyten, D. G. Hall // *Toxicol Pathol.* – 2011. – Vol. 39, № 1. – P. 58–65.

205. Pulsinelli, W. A. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia / W. A. Pulsinelli, J. B. Brierley, F. Plum // *Ann Neurol.* – 1982. – Vol. 11. – P. 491–498.

206. Quillinan, N. Neuropathophysiology of Brain Injury / N. Quillinan, P. S. Herson, R. J. Travstman // *Anesthesiol.Clin.* – 2016 – Vol. 34, № 3 – P. 453–464

207. Rami, A. Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? / A. Rami // *Neuropathol Appl Neurobiol.* – 2009. – Vol. 35, № 5. – P. 449–461.

208. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway / Y. M. Morizawa, Y. Hirayama, N. Ohno [et al.] // *Nat Commun.* – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 28.

209. Rebola, N. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding / N. Rebola, M. Carta, C. Mülle // *Nat Rev Neurosci.* – 2017. – Vol. 18, № 4. – P. 208–220.

210. Regulation of microglia and macrophage polarization via apoptosis signal-regulating kinase 1 silencing after ischemic/hypoxic injury / S. Y. Cheon, E. J. Kim, J. M. Kim [et al.] // *Frontiers in Molecular Neuroscience.* – 2017. – Vol. 10. – P. 261.

211. Remote Ischemic Postconditioning Inhibits Hippocampal Neuronal Apoptosis and Mitophagy After Cardiopulmonary Resuscitation in Rats / B. Xie, X. Gao, Y. Huang [et al.] // *Shock.* – 2021. – Vol. 55, № 1. – P. 74–82.

212. Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions / D. Bavelier, D. M. Levi, R. W. Li [et al.] // *J Neurosci.* – 2010. – Vol. 30. – P. 14964–14971.

213. Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In

Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals / H. Wake, A. J. Moorhouse, S. Jinno [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2009. – Vol. 29, № 13. – P. 3974–3980.

214. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank / A. J. Grau, C. Weimar, F. Buggle [et al.] // *Stroke* – 2001 – Vol. 32 – P. 2559–2566.

215. RNA sequencing reveals novel macrophage transcriptome favoring neurovascular plasticity after ischemic stroke / R. Wang, Y. Liu, Q. Ye [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2020. – Vol. 40, № 4. – P. 720–738.

216. Role of endoplasmic reticulum stress in brain damage after cardiopulmonary resuscitation in rats / J. Zhang, X. Xie, H. Pan [et al.] // *Shock*. – 2015. – Vol. 44, № 1. – P. 65–71.

217. Salter, M. W. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS / M. W. Salter, S. Beggs // *Cell*. – 2014. – Vol. 158. – P. 15–24.

218. Saxena, S. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration / S. Saxena, P. Caroni // *Neuron*. 2011. – Vol. 71, № 1. – P. 35–48.

219. Schmued, L. C. Fluoro-Jade: Novel Fluorochromes for Detecting Toxicant-Induced Neuronal Degeneration / L. C. Schmued, K. J. Hopkins // *Toxicologic Pathology*. – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 91–99.

220. Schneider, A. Cerebral resuscitation after cardio-circulatory arrest / A. Schneider, B. W. Bottiger, E. Popp // *Anesth. Analg*. – 2009. – Vol. 108, № 3. – P. 971–979.

221. Schneider, J. Role of Astrocytes in the Neurogenic Niches / J. Schneider, J. Karpf, R. Beckervordersandforth // *Methods Mol Biol*. – 2019. – Vol. 1938. – P. 19–33.

222. Schultz, C. Anatomy of the hippocampal formation / C. Schultz, M. Engelhardt // *Front Neurol Neurosci*. – 2014. – Vol. 34, № 6. – P. 17.

223. Schweizer, S. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia / S. Schweizer, A. Meisel, S. Märshenz // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2013. – Vol. 33.

– P. 1335–1346.

224. Sekerdag, E. Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options/ E. Sekerdag, I. Solaroglu, Y. Gursoy-Ozdemir // *Curr Neuropharmacol.* – 2018. – Vol. 16, № 9. – P. 1396–1415.

225. Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease / J-C. Baron, H. Yamauchi, M. Fujioka, M. Endres // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2014. – Vol. 34. – P. 2–18.

226. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological changes after 5-min ischemia and long survival times / P. Bonnekoeh, A. Barbier, U. Oschlies, K. A. Hossmann // *Acta Neuropathol.* – 1990. – Vol. 80, № 1. – P. 18–25.

227. Shetty, A. K. Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection? / A. K. Shetty // *Epilepsy Behav.* – 2014. – Vol. 38. – P. 117–124.

228. Shichita, T. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection / T. Shichita, M. Ito, A. Yoshimura // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P. 319.

229. Smith, T. G. Jr. Fractal methods and results in cellular morphology / T. G. Jr. Smith, G. D. Lange, W. B. Marks // *J. Neurosci. Methods.* – 1996. – Vol. 69. – P. 1123–1126.

230. Snyder, J. S. Recalibrating the relevance of adult neurogenesis / J. S. Snyder // *Trends Neurosci.* – 2019. – Vol. 42, № 3. – P. 164–178.

231. Spatial dynamics of vascular and biochemical injury in rat hippocampus following striatal injury and a β toxicity / Z. Amtul, C. Frías, J. Randhawa [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2019. – Vol. 56, № 4. – P. 2714–2727.

232. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury / J. H. Cole, A. Jolly, S. de Simoni [et al.] // *Brain.* – 2018. – Vol. 141, № 3. – P. 822–836.

233. Stogsdill, J. A. The interplay between neurons and glia in synapse development and plasticity / J. A. Stogsdill, C. Eroglu // *Curr Opin Neurobiol.* – 2017. – Vol. 42. – P. 1–8.

234. Striatal astrocytes transdifferentiate into functional mature neurons following ischemic brain injury/ C.-L. Duan, C.-W. Liu, S.-W. Shen [et al.] // *Glia* – 2015 – Vol. 63 – P. 1660–1670.

235. Structural features of ischemic damage in the hippocampus / A. G. Nikonenko, L. Radenovic, P. R. Andjus, G. G. Skibo // *The anatomical record.* – 2009. – Vol. 292. – P. 1914–1921.

236. Structure and function of mitochondrial complex I / C. Wirth, U. Brandt, C. Hunte, V. Zickermann // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – Vol. 1857, № 7. – P. 902–914.

237. Südhof, T. C. Towards an understanding of synapse formation / T. C. Südhof // *Neuron.* – 2018. – Vol. 100, № 2. – P. 276–293.

238. Synapse loss in dementias / R. Clare, V. G. King, M. Wirenfeldt, H. V. Vinters // *J Neurosci Res.* – 2010. – Vol. 88, № 10. – P. 2083–2090.

239. Tang, H. M. Cell recovery by reversal of ferroptosis / H. M. Tang, H. L. Tang // *Biol Open.* – 2019. – Vol. 8, № 6. – P. bio043182.

240. Temporal profiles of axon terminals, synapses and spines in the ischemic penumbra of the cerebral cortex ultrastructure of neuronal remodeling / U. Ito, T. Kuroiwa, J. Nagasao [et al.] // *Stroke.* – 2006. – Vol. 37. – P. 2134–2139.

241. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate / H. Ooigawa, H. Nawashiro, S. Fukui [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2006. – Vol. 112. – P. 471–481.

242. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus / A. Wallraff, R. Köhling, U. Heinemann, M. Theis // *J Neurosci.* – 2006. – Vol. 26, № 20. – P. 5438–5447.

243. The Kynurenine Pathway in the Acute and Chronic Phases of Cerebral Ischemia / M. I. Cuartero, J. Parra, A. García-Culebras [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2016 – Vol. 22, № 8 – P. 1060–1073.

244. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex / W. Liu, T. Ge, Y. Leng [et al.] // *Neural Plasticity Volume.* – 2017. –

Vol. 2017. – P. 1–11.

245. The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke / S. Liu, D. Agalliu, C. Yu, M. Fisher // *Curr. Pharm. Des.* – 2012. – Vol. 18, № 25. – P. 3653–3662.

246. Tlr2 Deficiency is associated with enhanced elements of neuronal repair and caspase-3 activation following brain ischemia / D. Gorup, S. Škokić, J. Kriz [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 2821.

247. Toda, T. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity / T. Toda, F. H. Gage // *Cell Tissue Res.* – 2018. – Vol. 373, № 3. – P. 693–709.

248. Two region-dependent pathways of eosinophilic neuronal death after transient cerebral ischemia / L. Sun, T. Kuroiwa, S. Ishibashi [et al.] // *Neuropathology.* – 2009. – Vol. 29. – P. 45–54.

249. Uniquely hominid features of adult human astrocytes / N. A. Oberheim, T. Takano, X. Han [et al.] // *J Neurosci.* – 2009. – Vol. 29, № 10. – P. 3276–3287.

250. Van den Bedem, H. Molecular mechanisms of chronic traumatic encephalopathy / H. Van den Bedem, E. Kuhl // *Curr. Opin. Biomed. Eng.* – 2017. – Vol. 1. – P. 23–30.

251. Visualization of cell death in mice with focal cerebral ischemia using fluorescent annexin A5, propidium iodide, and TUNEL staining / P. Bahmani, E. Schellenberger, J. Klohs [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2011. – Vol. 31. – P. 1311–1320.

252. Von Bernhardi, R. Glial cells in health and disease of the CNS (Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 949) / R. von Bernhardi. – 1st ed. – Switzerland : Springer International Publishing, 2016. – 359 p.

253. Von Bernhardi, R. What Is NeuralPlasticity? / R. von Bernhardi, L. E. Bernhardi, J. Eugénin // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2017 – Vol. 1015. – P. 1–15.

254. Zeng, Y. S. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia / Y. S. Zeng, Z. C. Xu // *Neurosci Res.* – 2000. – Vol. 37. – P. 113–125.

255. Zille, M. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia:

promises, problems, and perspectives / M. Zille, T. D. Farr, I. Przesdzing // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2012. – Vol. 32. – P. 213–231.

256. Zimatkin, S. M. Dark Neurons of the Brain / S. M. Zimatkin, E. I. Bon // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2018. – Vol. 48. – P. 908–912.

257. δ -Opioid receptor activation ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis by inhibiting the MAPK/caspase-3 pathway in BV2 microglial cells / M. Cheng, Y. Geng, Y. Chen [et al.] // *Exp Brain Res*. – 2020. – Vol. 239, № 2. – P. 401–412.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Область интереса CA₁ гиппокампа (а – оригинальное изображение; б – применение плагина; в, г – соответствующие маски, 1 сут после 20 мин ООСА). С. 46
2. Рисунок 2 – CA₁ гиппокампа (а, в – контроль; б, г – 1 сут после 20 мин ООСА): технология морфометрического измерения зон максимальной яркости изображения: а, б – стандартная случайно выделенная область интересов; в, г – результат применения фильтра «Find Maxima» и плагина «Analyze Particles». Зоны максимальной яркости (б1, г1) имеют сложную форму. После 20 мин ООСА количество зон визуально больше, чем в норме. На выделенной области интереса выявлено 71 зона максимальной яркости (б1), которые занимают 11,1 % ее площади (г1). С. 47
3. Рисунок 3 – Фрактальные размерности (FD) отдельных масок (а) и контуров (б) различных астроцитов гиппокампа и неокортекса животных контрольной группы, полученные на основе расчетных данных с использованием модуля для фрактального анализа бинарных изображений FracLac 2.5 в программе ImageJ 1.53с: а- Me = 1,42 (Q1 = 1,40, Q3 = 1,46); б-Q2 = 1,35 (Q1 = 1,33, Q3 = 1,39). Коэффициент корреляции (r²) для линии регрессии = 0,992–0,995. Объектив: × 40, шкала – 50 мкм. С. 51
4. Рисунок 4 – Гиппокампальная формация белой крысы в контроле: экранное образование, выделяется молекулярный слой (*), слой пирамидных нейронов (поля CA₁, CA₃), полиморфный слой (^). Стрелки – зубчатая извилина (gyrus dentatus, извилина). Окраска: гематоксилин-эозином, объектив × 4, шкала – 500 мкм. С. 55
5. Рисунок 5 – Поля CA₁ (а), CA₃ (б) гиппокампа и зубчатая извилина (в) контрольных белых крыс: неразветвленные апикальные дендриты (красная стрелка) в *stratum radiatum* CA₁, *stratum lucidum*

- в молекулярном слое (*) CA₃. Белые стрелки – пирамидные нейроны, ^ – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимия, типирование MAP-2. Докраска гематоксилином, объектив × 100, шкала – 20 мкм. С. 56
6. Рисунок 6 – Поля CA₁ (а, в) и CA₃ (б) гиппокампа контрольных животных: преобладают нормохромные нейроны (большие стрелки), видны единичные нейроны с признаками коагуляционно-ишемического некроза (мелкие стрелки). Окраска гематоксилин-эозином, объектив × 100, шкала – 20 мкм (а, б), × 40, шкала – 50 мкм (в). С. 57
7. Рисунок 7 – Поля CA₁ (а), CA₃ (б) гиппокампа и зубчатая извилина (в) через 1 сут после 20 мин ООСА: появляются нейроны с признаками коагуляционно-ишемического некроза (белые стрелки), большое количество глиальных клеток (красные стрелки). Окраска гематоксилин-эозином, объектив × 100, шкала – 20 мкм. С. 59
8. Рисунок 8 – Поля CA₁ (а, б), CA₃ (в, г) и CA₄ (д) гиппокампа через 1 сут после 20 мин ООСА: очаговые дегенеративные изменения нейронов, преобладают коагуляционно-ишемические (белые стрелки), очаговые скопления глиальных клеток (красные стрелки). Окраска гематоксилин-эозином, объектив × 40, шкала – 50 мкм. . . . С. 60
9. Рисунок 9 – Поля CA₁ (а, б), CA₃ (в) и CA₄ (г) гиппокампа через 3 сут после 20 мин ООСА: сохраняются очаговые дегенеративные изменения нейронов, коагуляционно-ишемического типа (белые стрелки). Окраска по Нисслю, объектив × 40, шкала – 50 мкм. С. 61
10. Рисунок 10 – Поля CA₁ (а), CA₃ (б, в) и CA₄ (г) гиппокампа через 14 сут после 20 мин ООСА: сохраняются очаговые дегенеративные изменения крупных пирамидных нейронов, коагуляционно-ишемического типа (белые стрелки). Окраска по Нисслю, объектив × 40, шкала – 50 мкм. С. 62

11. Рисунок 11 – Нейроны поля СА₃ гиппокампа с разным количеством ядрышек через 3 сут после 20 мин ООСА: увеличение доли нейронов с двумя ядрышками (белая стрелка). Красная стрелка – гиперхромные пикноморфные нейроны. Окраска: гематоксилин-эозином, объектив × 100, шкала – 20 мкм. С. 63
12. Рисунок 12 – Общая численная плотность пирамидных (СА₁ и СА₃) и полиморфных (СА₄) нейронов в гиппокампе белых крыс в норме и после 20 мин ООСА. С. 69
13. Рисунок 13 – Фрагменты поля СА₁ (а) и СА₃ (б) гиппокампа головного мозга белых крыс в норме: вокруг тел и дендритов пирамидных нейронов (красные стрелки), в нейропиле (*) молекулярного и полиморфного (^) слоев располагается большое количество структурированного p38-позитивного материала – синаптические терминали; в *stratum radiatum* СА₁ расположены крупные не ветвящиеся апикальные дендриты. С. 71
14. Рисунок 14 – Поля СА₁ (а) и СА₃ (б) гиппокампа контрольных белых крыс: демонстрация выявления и локализации *stratum lucidum* (*) в молекулярном слое СА₃. Стрелки – пирамидные нейроны, ^ – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимия, типирование MAP-2. Докраска гематоксилином, объектив × 100, шкала – 20 мкм. С. 72
15. Рисунок 15 – Фрагменты поля СА₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а, б) сут после 20 мин ООСА: а – проявления гидропической дистрофии (отек-набухание нейропиля, астроцитов, нейронов), высокая плотность астроцитов, уменьшение доли нормохромных нейронов; б – уменьшение количества гигантских терминалей в *stratum lucidum*. С. 74
16. Рисунок 16 – Поле СА₃ гиппокампа белой крысы через 1 сут после 20 мин ООСА: проявления отека-набухания (*) слоя пирамидных нейронов (стрелки) и *stratum lucidum*. Стрелки – темные

- (сморщенные) пирамидные нейроны. Окраска: иммуногистохимия, типирование MAP-2. Докраска гематоксилином, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм. С. 75
17. Рисунок 17 – Фрагменты поля CA₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а), 3 (б) сут после 20 мин ООСА: увеличение доли гиперхромных сморщенных нейронов (стрелки) с выраженной конденсацией цитоматрикса по периферии перикариона и дендритах. Окраска: иммуногистохимия, типирование MAP-2, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм. С. 76
18. Рисунок 18 – Фрагменты *stratum lucidum* поля CA₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а), 3 (б) и 7 (в) сут после 20 мин ООСА: через 1 сут (а) отмечалось явное уменьшение плотности и яркости окраски p38-позитивных структур, фрагментация синаптических терминалей; через 3 сут (б) появлялось большое количество крупных интенсивно окрашенных синаптических терминалей вокруг тел и отростков пирамидных нейронов (стрелки); через 7 (в) сут восстанавливалось распределение и интенсивность окраски терминалей до контрольного вида. Окраска: иммуногистохимия, типирование p38, объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм. С. 77
19. Рисунок 19 – Общая численная плотность (а) и относительная площадь (б) гигантских терминалей в поле CA₃ после 20 мин ООСА: через 1 сут происходит разрушение части синапсов с уменьшением плотности и общей площади их терминалей. Материал представлен как медиана (50 %), 25–75 % квартили (бокс), диапазон без выбросов (Min-Max). С. 78
20. Рисунок 20 – Относительная площадь (%) частиц p38-позитивного материала в зоне дендритов (*stratum lucidum*) и тел пирамидных нейронов поля CA₃ гиппокампа белых крыс в норме и после 20 мин ООСА, иммуногистохимическое типирование p38. С. 79
21. Рисунок 21 – Поле CA₃ гиппокампа контрольных белых крыс:

- наличие гигантских терминалей в *stratum lucidum* (стрелки) при иммуногистохимической окраске против синаптофизина (*a*) и каспазы-3 (*б*). Докраска гематоксилином, объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм. С. 81
22. Рисунок 22 – Относительная (%) площадь меток p38 и CASP3 в *stratum radiatum* поля CA₁ гиппокампа белых крыс в норме и после 20 мин ООСА. С. 83
23. Рисунок 23 – Относительная (%) площадь меток p38 и CASP3 в *stratum lucidum* поля CA₃ гиппокампа белых крыс в норме и после 20 мин ООСА. С. 84
24. Рисунок 24 – Фрагменты поля CA₃ и CA₄ гиппокампа через 3 сут после 20 мин ООСА: большое количество астроцитов (стрелки). . . . С. 88
25. Рисунок 25 – Фронтальный срез головного мозга на уровне гиппокампа, контроль: послойное распределение структур астроцитов. С. 90
26. Рисунок 26 – Волокнистые (желтые стрелки) и протоплазматические (красные стрелки) астроциты в различных отделах гиппокампа (через 3 сут после 20 мин ООСА): протоплазматические астроциты преобладают в слое пирамидных нейронов (*), а волокнистые – в молекулярном (МС) и полиморфном (ПС) слоях. Окраска: иммуногистохимическое типирование GFAP, докраска гематоксилином, объектив $\times 40$ (*a*) и $\times 100$ (*б, в*), шкалы: 50 мкм (*a*) и 20 мкм (*б, в*). С. 91
27. Рисунок 27 – Фрактальная размерность (2D) глиальной сети различных слоев поля CA₁ у животных в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q2). С. 95
28. Рисунок 28 – Лакунарность глиальной сети (2D) различных слоев поля CA₁ у животных в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q2). С. 96
29. Рисунок 29 – Структуры, содержащие GFAP-позитивный материал

- (красные стрелки) в различных отделах поля СА₁ гиппокапа (через 14 сут после 20 мин ООСА): большое количество крупных ветвей волокнистых астроцитов в молекулярном (*) и меньше в полиморфном (^) слоях. С. 97
30. Рисунок 30 – Зубчатая извилина гиппокампа белых крыс, контроль: а – гематоксилин-эозином; б – иммуногистохимия, MAP-2. Белые стрелки – гранулярный, * – молекулярный, ПС – полиморфный слой. Объектив: × 40, шкала – 60 мкм. С. 98
31. Рисунок 31 – Поле СА₄ и ЗИ гиппокампа белых крыс, 1 сут после 20 мин ООСА: а – нормо- и гиперхромные нейроны (окраска по Нисслю); б – иммуногистохимия (MAP-2). С. 100
32. Рисунок 32 – Фронтальные срезы головного мозга на уровне гиппокампа: неравномерное распределение хромогена в слоях зубчатой извилины в контроле (а), через 6 ч (б), 1 сут (в), 3 сут (г), 14 сут (д) и 30 сут (е) после 20 мин ООСА. С. 102
33. Рисунок 33 – Протоплазматические астроциты СА₄ через 6 ч после 20 мин ООСА: а – большое количество мелких отростков на основных стволах, б – структурная связь отростков астроцитов с микрососудом, в, г – увеличение плотности распределения астроцитов между нейронами и их домены (г). С. 103
34. Рисунок 34 – Фиброзные астроциты зубчатой извилины и СА₄ через 1 сут после 20 мин ООСА: а – гипертрофия отростков астроцитов в молекулярном слое зубчатой извилины, б – увеличение плотности распределения астроцитов в полиморфном слое, в – увеличение плотности распределения астроцитов внутри клеточного слоя СА₄, г – гипертрофия отростков астроцитов в гранулярном слое зубчатой извилины. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином, объектив × 100, шкала – 25 мкм. С. 105
35. Рисунок 35 – Наглядное представление сравнения динамики

- фрактальной размерности астроцитарной сети поля CA_1 и ЗИ: критический период – через 3 сут. С. 109
36. Рисунок 36 – Наглядное представление сравнения динамики лакунарности астроцитарной сети поля CA_1 и ЗИ: критический период – через 1 сут. С. 110
37. Рисунок 37 – Основные участники процесса реорганизации межклеточных взаимоотношений в гиппокампе после 20 мин ООСА: а – нейроны слоя CA_1 , б – нейроны слоя CA_3 , в – синаптические терминалы, г – астроциты.* – перикарионы, стрелки – локализация меток MAP-2, p38 и GFAP. Окраска: иммуногистохимическая реакция на MAP-2, p38 и GFAP, докраска гематоксилином. Объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм. С. 111
38. Таблица 1 – Доля нейронов, имеющих два и более ядрышка гиппокампе белых крыс в норме и постишемическом периоде. С. 64
39. Таблица 2 – Доля нормохромных пирамидных нейронов (из 200 верифицированных по ядрышку на каждый срок в группе) в поле CA_3 гиппокампа белых крыс в норме, после 20 мин ООСА и ТЧМТ. С. 66
40. Таблица 3 – Общая численная плотность пирамидных нейронов (на 1 мм^2) в поле CA_3 гиппокампа белых крыс в норме, после 20 мин ООСА (по 50 полей зрения на каждый срок), Q2 (Q1-Q3) и Min-Max. С. 67
41. Таблица 4 – Относительный объем (%) зон отека-набухания в поле CA_3 гиппокампа белых крыс в норме, после 20 мин ООСА (по 50 полей зрения на каждый срок), Q2 (Q1-Q3) и Min-Max. С. 68
42. Таблица 5 – Доля пирамидных нейронов (из 200 верифицированных по ядрышку на каждый срок в группе) с двумя и более ядрышками в поле CA_3 гиппокампа белых крыс в норме, после 20 мин ООСА. С. 68
43. Таблица 6 – Нейроглиальные отношения (НГИ) в гиппокампе белых крыс в норме и после ООСА, Q2 (Q1-Q3), окраска по

	Ниссля.	С. 88
44.	Таблица 7 – Относительный объем/площадь (%) всех типов астроцитов (<i>GFAP</i>) в поле СА ₃ гиппокампа белых крыс в норме, после ООСА, Q2 (Q1-Q3).	С. 92
45.	Таблица 8 – Морфометрическая характеристика нейронов и астроцитов зубчатой извилины и СА ₄ гиппокампа головного мозга белых крыс в контроле, окраска по Ниссля, Q2 (Q1-Q2).	С. 99
46.	Таблица 9 – Численная плотность нормохромных нейронов в зубчатой извилине и СА ₄ гиппокампа (на 1 мм ² поля зрения) в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q3).	С. 100
47.	Таблица 10 – Относительная площадь (%) хромогена при иммуногистохимическом выявлении (<i>GFAP</i>) элементов глиальной сети зубчатой извилины у животных контрольной и основной группы, Q2 (Q1-Q3).	С. 106
48.	Таблица 11 – Фрактальная размерность (ФР) глиальной (<i>GFAP</i>) сети различных слоев зубчатой извилины в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q3).	С. 107
49.	Таблица 12 – Лакунарность (Λ) глиальной сети различных слоев зубчатой извилины в контроле и после 20 мин ООСА, Q2 (Q1-Q3). .	С. 107