

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

На правах рукописи

Макарьева Любовь Михайловна

**ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОГЛИАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СЕНСОМОТОРНОЙ
КОРЫ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ПЕРЕВЯЗКЕ 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 – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	4
ГЛАВА 1 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ В НОРМЕ И ПОСЛЕ НЕОБРАТИМОЙ ДВУСТОРОННЕЙ ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ (СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ)	13
1.1 Особенности анатомо-гистологического строения сенсомоторной коры и кровоснабжения головного мозга.	13
1.2 Необратимая двусторонняя перевязка общих сонных артерий, как модель гипоперфузии головного мозга.	22
1.3 Закономерности синхронных проявлений реорганизации нейронов и глиальных клеток в компенсаторно-восстановительных процессах нервной ткани при ишемии.	24
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	38
2.1 Дизайн исследования.	38
2.2 Объект и предмет исследования.	41
2.3 Методы исследования.	44
2.4 Статистический анализ.	50
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.	51
3.1 Гистологическое исследование цитоархитектоники сенсомоторной коры мозга крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий.	51
3.2 Морфометрическая характеристика нейроглиальных взаимоотношений сенсомоторной коры мозга крыс при неполной глобальной ишемии.	68
3.3 Иммуногистохимическое исследование пирамидных нейронов и структур межнейронной коммуникации сенсомоторной коры.	78
3.4 Иммуногистохимическая характеристика глиальных клеток.	97
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.	111
ВЫВОДЫ.	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	129
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Важнейшей и актуальной проблемой нейробиологии является изучение реакции нервной ткани на ишемию и постишемическое повреждение [20]. В этом направлении накоплен значительный экспериментальный материал по всем научным направлениям, включая и морфологические науки [10, 16, 25, 45]. Дисциркуляторные энцефалопатии признаются одной из ведущих причин смертности и инвалидности в мире [57]. Хроническое нарушение мозгового кровотока может вызвать неврологический дефицит и деменцию [70]. Основной причиной сосудистого когнитивного нарушения является тяжелая гипоперфузия [151].

Сенсомоторная кора – многослойное, многомодульное гетероморфное по клеточному составу образование, включает различные проводящие пути, здесь заканчиваются поля глубокой и поверхностной чувствительности [4, 24, 72]. Входящие в ее состав сенсорная и моторная кора связаны посредством мощной дисинаптической обратной петли слоев III и V сенсорной коры со слоями III и V моторной коры [177]. Цито-, дендро-, синапто- и глиоархитектоника СМК в норме и после ишемии в настоящее время хорошо изучены и суммированы в многочисленных обзорах [1, 66, 159, 205]. Изучение СМК в настоящее время в основном связано с детализацией уже известных механизмов реакции нервной ткани. Это обеспечивается научно-техническим прогрессом в области усовершенствования методик морфологических исследований. Особую роль играют новые иммуногистохимические и морфометрические направления нейроморфологии. Появление нейроспецифических моноклональных антител и средств их визуализации еще больше сблизило понятия «структура» и «функция», а методы компьютерного анализа цифровых изображений позволяют стандартно, объективно и точно оценивать все количественные изменения нервной ткани. В этой связи необходимо использовать появившиеся возможности для более глубокого изучения структурно-функциональных механизмов постишемической

реорганизации межнейронных и нейроглиальных взаимоотношений СМК.

Известно, что неполная глобальная ишемия, смоделированная путем необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий, приводит к деструкции и гибели нейронов в высокочувствительных к ишемии отделах головного мозга, в том числе СМК [45, 117, 228]. Особенностью модели на белых крысах является диффузный характер повреждения нервной ткани и сохранение определенного уровня кровотока, благодаря неравномерному его снижению в разных отделах головного мозга и существованию коллатерального кровообращения [7, 138].

Показано, что быстрым обратимым ответом нервной ткани на любое воздействие является появление нейронов с изменением тинкториальных свойств нейронов (гипо- и гиперхромия) [10, 48, 205, 237]. При ишемии головного мозга встречаются гиперхромные нейроны без признаков грубой деструкции ядра и цитоплазмы и умеренным уменьшением перикариона, как результат конформационных изменений белков цитоматрикса (обратимые деструктивные проявления) и гиперхромные нейроны с утратой базофильного вещества, гомогенизацией цитоплазмы, сморщиванием перикариона (гиперхромные сморщенные нейроны) – необратимо измененные нейроны [22, 26, 28, 168]. Происходит усиление экспрессии нейромаркера NSE, который необходим для анаэробного превращения глюкозы в метаболиты, пригодные для окисления. Интенсивность экспрессии этого фермента говорит о разной метаболической активности нейронов [1, 168].

Особый интерес в последнее время связан с изучением глиальных клеток и нейронов в составе их интегрированных структурно-функциональных систем – например, нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов [213, 84, 239]. Астроциты в этих комплексах выполняют существенную роль для сохранения ионного гомеостаза, клиренса нейротрансмиттеров, обладают ангиогенным, нейропротекторным действием и моделируют синаптическую передачу [147, 21]. Микроглиоциты являются компонентом собственной иммунной системы головного мозга и принимают участие в санации нервной ткани при повреждении

[113]. Однако реакция астроцитов и микроглиоцитов при ишемии требует дальнейшего изучения и уточнения. Известно, что после ишемии приобретается или M1/A1 фенотип – повреждающий, или M2/A2 фенотип – нейропротективный. Уточняется как это происходит. Длительное превалирование повреждающего фенотипа приводит к появлению нейродегенеративных изменений, а активация нейропротективного фенотипа – способствует восстановлению обратимо поврежденных нейронов и реализации механизмов нейропластичности [101, 139, 208].

Таким образом, в настоящее время с помощью различных морфологических методов исследования хорошо изучены структурные изменения СМК экспериментальных животных (крысы, мыши, монгольские песчанки, собаки, кролики, кошки) и человека при ишемии и в постшемическом периоде. Однако, появление новых данных неизбежно приводит к расширению нейробиологических исследований и необходимости изучения состояния структурно-функциональных комплексов СМК как целостных систем.

Поэтому настоящее исследование было посвящено поиску новых данных о закономерностях реорганизации нервной ткани СМК головного мозга при длительной неполной глобальной ишемии после двусторонней необратимой перевязки общих сонных артерий. Комплексное исследование включало световое, иммуногистохимическое, электронномикроскопическое и морфометрическое изучение изменений нейронов, глиальных клеток и синапсов слоев I, III и V СМК мозга крыс. Это необходимо для дальнейшего понимания закономерностей реакции нервной ткани СМК на ишемическое воздействие и уточнения количественных особенностей, происходящих при этом структурно-функциональных изменений.

Степень разработанности темы диссертации

Анализ литературных данных свидетельствует о недостаточности информации для понимания фундаментальных механизмов нейроглиальных взаимоотношений при диффузном повреждении СМК после необратимой

двусторонней ПОСА. Таких работ мало, плохо изученными являются закономерности пространственной реорганизации цитоархитектоники и отростков астроцитов в сравнительном аспекте – в слоях I, III и V СМК. Данное диссертационное исследование вносит вклад в изучение тяжелой 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 СМК головного мозга белых крыс при диффузно-очаговых ишемических повреждениях, вызванных необратимой двусторонней ПОСА. Объектом исследования были нейроны, межнейронные синапсы и глиальные клетки.

Цель исследования

Выявить особенности структурно-функциональной реорганизации сенсомоторной коры белых крыс после перевязки общих сонных артерий.

Задачи исследования

1. Изучить цито-, дендро-, синаптоархитектонику и дать сравнительную иммуногистохимическую характеристику нейронов, глиальных клеток и синапсов слоев I, III и V сенсомоторной коры мозга крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после перевязки общих сонных артерий.

2. С помощью фрактального анализа оценить количественные изменения и особенности пространственной реорганизации отростков астроцитов сенсомоторной коры мозга крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после перевязки общих сонных артерий.

3. Изучить количественные особенности структурных проявлений отека-набухания нервной ткани сенсомоторной коры через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после перевязки общих сонных артерий.

Научная новизна

Получены новые данные о наличии динамики прижизненных дегенеративных изменений нейронов СМК. Образование дегенеративно измененных нейронов и снижение общей численной плотности нейронов происходит на протяжении всего исследуемого периода с сохранением высокой численной плотности необратимо поврежденных нейронов через 30 сут после ПОСА. Это свидетельствует о том, что восстановление нейронов после ПОСА происходило на фоне существования вторичных повреждающих факторов и требовало значительно большего времени.

Установлен гетерохронный и гетероморфный характер реорганизации нейроглиальных и межнейронных взаимоотношений в разных слоях I, III и V СМК мозга крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после перевязки общих сонных артерий.

Впервые с помощью иммуногистохимических и морфометрических методов установлено наличие статистически значимых сильных корреляционных связей между площадью р38-позитивного материала и выраженностью отека-набухания нейропиля. В большей степени страдал вторичный проекционный комплекс СМК. Реорганизация нейроглиальных и межнейронных взаимоотношений происходила на фоне выраженных проявлений гипергидратации нейропиля.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты данной работы дополняют информацию о морфологии головного мозга экспериментальных животных в норме и после неполной глобальной ишемии. В исследовании получены важные данные для понимания процессов повреждения, компенсации и восстановления, происходящих в сенсомоторной коре головного мозга белых крыс через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий. Количественные данные позволили оценить особенности нейроглиальных взаимоотношений межнейронной коммуникации сенсомоторной коры в ответ на ишемическое/гипоксическое воздействие. 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

В соответствии с целью и задачами научно-квалификационной работы стало изучение изменений СМК крыс линии Wistar в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после перевязки общих сонных артерий. В работе применен комплексный подход для количественного и качественного исследования нейронов, синапсов и глиальных клеток, для этого мы использовали гистологические, иммуногистохимические, электронномикроскопические и морфометрические методы исследования. В частности, с помощью программы ImageJ 1.53 мы осуществляли количественную оценку нейронов, глиальных клеток, синаптических терминалей СМК мозга крыс в норме и в постишемическом периоде. Пространственную реорганизацию отростков глиальных клеток изучали с помощью фрактального анализа. Все это позволило оценить процессы повреждения и компенсаторно-восстановительной структурно-функциональной реорганизации нейронов, синапсов и глиальных клеток после ишемического воздействия.

Положения, выносимые на защиту

1. В сенсомоторной коре в остром периоде (1–7 сутки) после перевязки общих сонных артерий активируются и преобладают деструктивные изменения нейронов и глиальных клеток: появляются сморщенные и несморщенные гиперхромные нейроны, клетки-тени, гипохромные нейроны, нейроны с признаками отека-набухания, разрушением перикариона, усилением фагоцитоза. Происходит деструкция цитоскелета перикариона, дендритного дерева нейронов и глиальных клеток, изменяется количество и форма синаптических терминалей.

2. В подостром периоде (14–30 сутки) после перевязки общих сонных артерий, на фоне сохранения проявлений гипер- и дегидратации нервной ткани в сенсомоторной коре, реализуются компенсаторно-восстановительные процессы.

Снижается доля темных нейронов, уменьшаются проявления отека-набухания, восстанавливается цитоскелет нейронов, увеличиваются площадь терминалей, количество мелких ветвей астроцитов. В результате усложняется пространственная организация дендритного дерева и астроцитов.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов объясняется достаточным объемом исследуемых групп и корректным формированием изучаемых выборок, а также применением контрольных групп при проведении эксперимента, использованием способов описательной статистики и критериев анализа в зависимости от типа данных, а также адекватностью математических методов обработки данных поставленным задачам с использованием актуального пакета статистического программного обеспечения.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной гистологии», посвященной 90-летию кафедры гистологии и эмбриологии им. проф. А. Г. Кнорре (Санкт-Петербург, 2022); 5-м Национальном конгрессе с международным участием «Здоровые дети – будущее страны» (Санкт-Петербург, 2021); Всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2021); Society for Neuroscience 50 Annual meeting (Chicago, USA, 2021).

Диссертационная работа апробирована на совместном заседании кафедр: гистологии, цитологии и эмбриологии; биологии; анатомии человека; патологической анатомии; судебной медицины, правоведения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России (Омск, 2022).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Омский

государственный медицинский университет» Минздрава России по теме: «Изменения нейроглиальной организации сенсомоторной коры белых крыс при перевязке общих сонных артерий», номер государственной регистрации АААА-А19-119012190022-4.

Внедрение результатов исследования

Данные, полученные в результате исследования и сформированные в виде зарегистрированной базы данных «Морфологическая характеристика пирамидных нейронов сенсомоторной коры белых крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий», внедрены в учебный процесс в объеме образовательных программ дисциплин «гистология, эмбриология, цитология», «биология», «патологическая физиология» кафедр: гистологии, цитологии и эмбриологии, биологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 19 научных работ, в том числе 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных и 12 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 4 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus).

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и состоит из введения, главы собственных данных, обсуждения результатов, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 241 источником, из которых 161 в зарубежных изданиях. Полученные результаты иллюстрированы с

помощью 1 таблицы и 55 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 СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ В НОРМЕ И ПОСЛЕ НЕОБРАТИМОЙ ДВУСТОРОННЕЙ ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ (СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ)

1.1 Особенности анатомо-гистологического строения сенсомоторной коры и кровоснабжения головного мозга

Анатомия и гистология СМК головного мозга белой крысы в норме хорошо изучены и имеются подробные обзоры, атласы топографии всех его отделов и сосудистого русла [52, 54, 55, 65, 78, 199]. Разработаны оптимальные стандарты получения гистологических препаратов без артефактов, а также практические подходы нейроанатомической специфической идентификации нервных клеток и их стереометрии [179, 231].

Моторная кора головного мозга крысы включает в себя первичную моторную кору (Fr1, Fr3) и области представительства грудной (FL) и тазовой (HL) конечностей. Соматосенсорная кора охватывает поля 1 (Par 1) и 2 (Par 2) теменной коры, представляющие собой первичную и вторичную соматосенсорную области (Рисунки 1 и 2) [52, 167].

На фронтальном срезе головного мозга крысы клеточный состав, ширина каждого слоя клеток и их расположение в каждом участке коры неодинаковы. Так, в моторной коре более выражен слой V, пирамидные нейроны которого имеют большую величину в сравнении с другими слоями. В соматосенсорной коре более выражены слои II и IV (Рисунок 3).

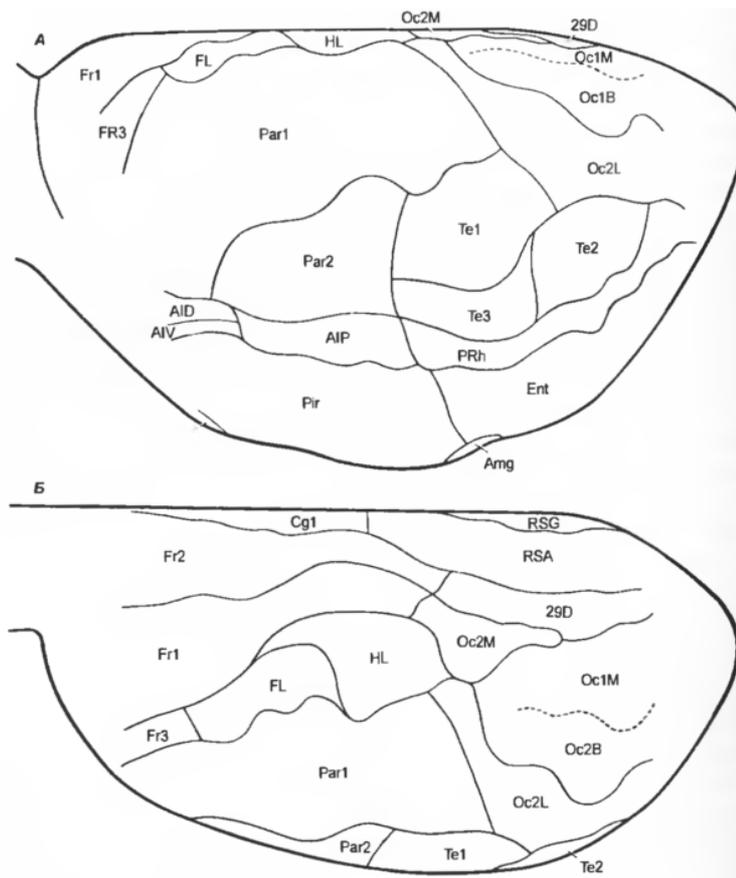


Рисунок 1 – Области коры с латеральной (А) и дорсальной (Б) поверхностей. Первичная моторная кора (Fr1, Fr3), области представительства грудной и тазовой (HL) конечностей; поля 1 (Par 1) и 2 (Par 2) теменной коры мозга крыс.

Ноздрачев Д. А., 2001

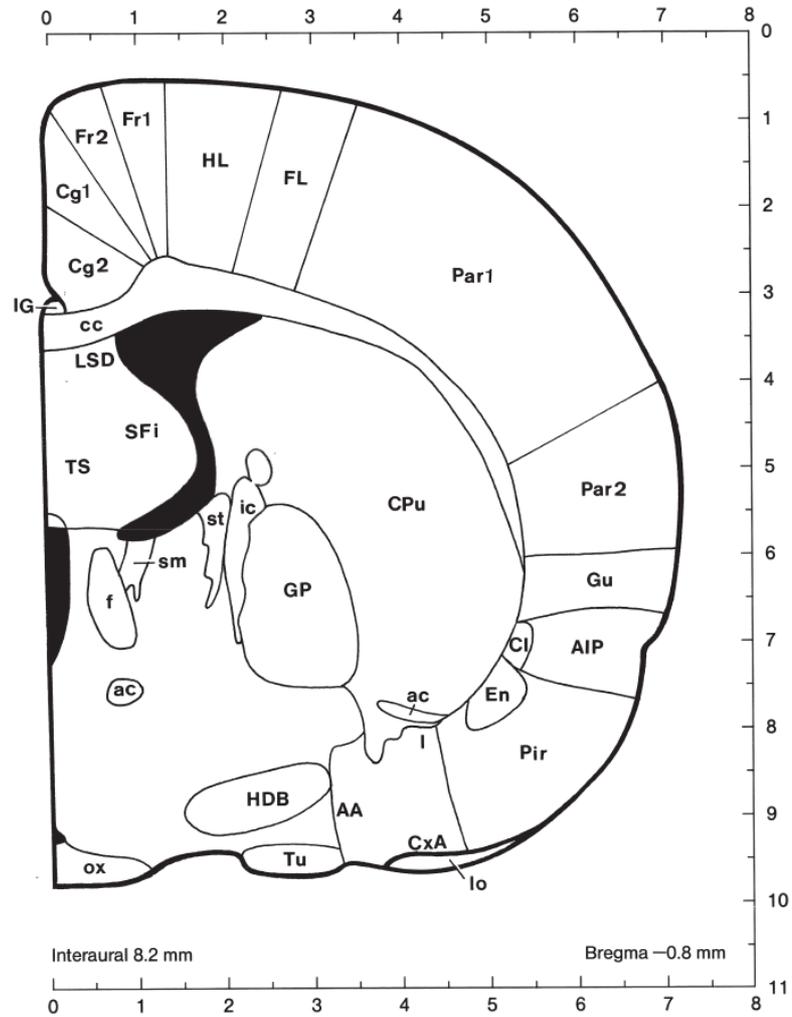


Рисунок 2 – Фронтальный срез головного мозга крысы. Первичная моторная кора (Fr1, Fr3), области представительства грудной (FL) и тазовой (HL) конечностей; поля 1 (Par 1) и 2 (Par 2) теменной коры. Zilles K., 1985

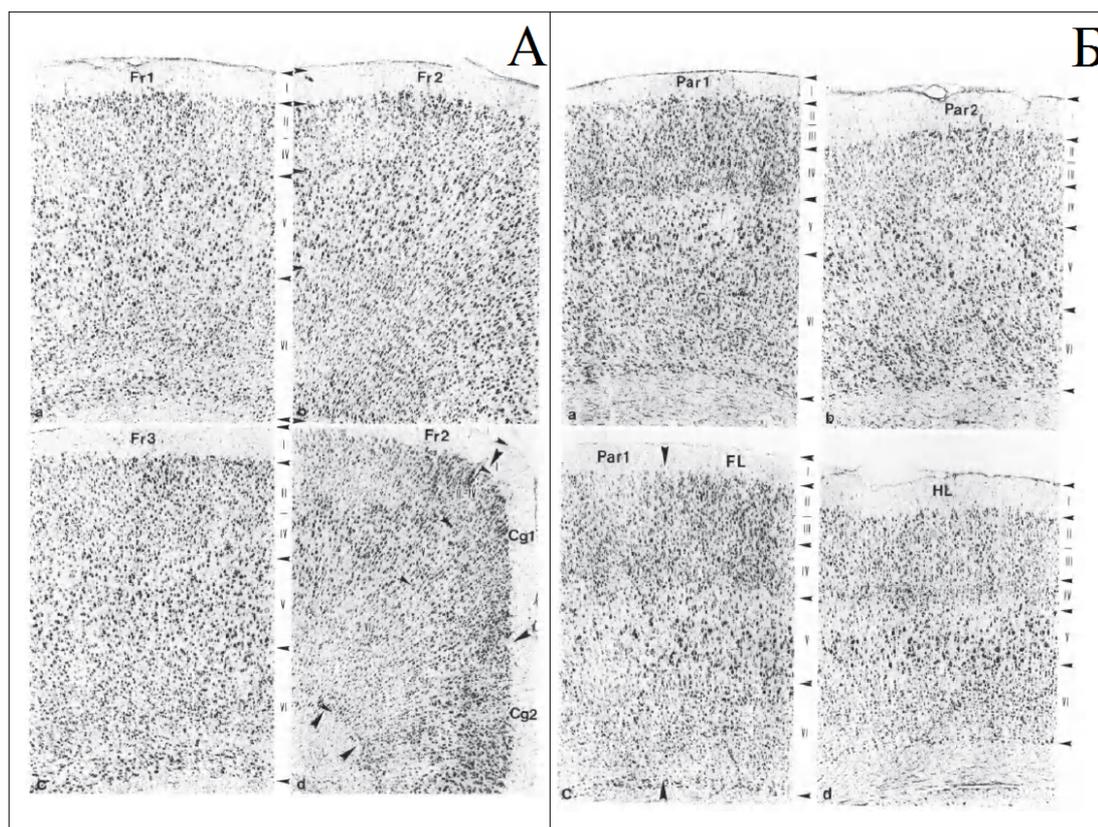


Рисунок 3 – Архитектоническое строение моторной (А) и соматосенсорной (Б) коры головного мозга крыс. Первичная моторная кора (Fr1, Fr3), области представления грудной (FL) и тазовой (HL) конечностей (А); поля 1 (Par 1) и 2 (Par 2) теменной коры (Б). bregma -0.3 Окраска по Нислю.

Увеличение объектива $\times 64$. Zilles K., 1985

В основе структурно-функциональной организации СМК головного мозга млекопитающих, в т. ч. и крыс, лежит сложное взаимодействие нескольких нейронных комплексов. Первичный проекционный нейронный комплекс представлен крупными пирамидными нейронами слоя V, вторичный проекционно-ассоциативный нейронный комплекс – пирамидными нейронами слоя III, а также их связями, в организации которых большое значение имеет нейропилль молекулярного слоя [59].

Молекулярный слой состоит из сплетений апикальных дендритов и аксонов нижележащих пирамидных нейронов. Слой I беден клеточными элементами. Здесь присутствуют горизонтальные клетки Кахаля, аксоны и дендриты которых

располагаются горизонтально [3]. Большую часть слоя I составляют терминальные ветвления отростков нейронов нижележащих слоев коры и других отделов мозга. В аксонных окончаниях молекулярного слоя выявлен целый комплекс медиаторов и нейропептидов [27]. Молекулярный слой коры головного мозга принимает участие в поддержании целостности ликворозенцефалического барьера посредством поверхностной глиальной пограничной мембраны, которая образована астроцитами [72]. Аfferентные волокна слоя I являются сильным входом на нейроны слоя III [43].

Слой II состоит преимущественно из звездчатых нейронов мелких и средних по размеру. Преобладают аксодендритические и аксосоматические тормозные ГАМКергические контакты. Синапсы по слою II расположены неравномерно и образуют синаптические комплексы. Слой II является входом комиссуральных и ассоциативных внутрикортикальных волокон, которые переключаются на нейронах этого слоя [27].

Слой III содержит пирамидные нейроны мелких и средних размеров, апикальные дендриты которых поднимаются до молекулярного слоя, а базальные дендриты распространяются на соседние пирамидные нейроны и интернейроны разного типа. Аксоны спускаются в белое вещество больших полушарий. Пирамидные нейроны данного слоя являются ассоциативными и передают импульс по кортико-кортикальным путям [4]. В слое III преобладают аксодендритические (аксошипиковые) контакты (55 %), появляется большое количество (12) аксоаксональных контактов, образованных аксонами специализированных тормозных звездчатых интернейронов [27].

Слой IV содержит в своем составе интернейроны разного типа и небольшое количество пирамидных нейронов. Здесь преобладают аксодендритические контакты (60 %), большое количество аксональных синапсов (12 %).

Слой V представлен крупными пирамидными нейронами, в области моторной коры гигантскими пирамидными клетками (клетками Беца), размеры которых могут достигать 80–120 мкм. Клетки Беца располагаются в прецентральной области [27]. Аксоны пирамидных нейронов направляются в ядра

спинного мозга и являются пирамидными путями. Дендриты апикальной поверхности достигают слоя I и отдают в нем терминали. Базально расположенные дендриты достигают соседних пирамидных нейронов в пределах слоя [4].

Слои III и V функционируют совместно [72, 232]. Сенсорная и моторная кора связаны посредством мощной дисинаптической обратной петли слоев III и V сенсорной коры со слоями III и V моторной коры [178]. Генерация активности нейронов в неокортексе происходит в связи с модульным принципом его организации.

Модульная организация нейронов связана с ангиоархитектоникой головного мозга, что обусловлено зависимостью структуры сосудистых сетей от организации нейронных ансамблей [7]. Сосудистые сети определяют кровотоки в головном мозге, структуры сосудистой архитектуры соответствуют границам нейронных модулей [14, 15]. Согласно литературным данным, в теменной коре головного мозга крыс подтверждено наличие связи между активностью митохондриальных ферментов цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы и плотностью распределения микрососудистого русла, последнее зависит от функциональной активности отделов мозга и различных модулей коры [15, 133, 88, 91, 99].

Кровоснабжение головного мозга крысы осуществляется по внутренним сонным артериям и позвоночным артериям. Внутренняя сонная артерия, проникая в сонный канал, входит в полость черепа и отдает ветви к структурам мозга. Кровоснабжает головной мозг крысы мозговая часть внутренней сонной артерии – *pars cerebrialis*, которая состоит из каудальной соединительной, ворсинчатой, ростральной и срединной мозговой артерии. Позвоночные артерии через большое (затылочное) отверстие входят в полость черепа и, сливаясь на уровне моста головного мозга, образуют базилярную артерию. Конечными ветвями базилярной артерии являются задние артерии мозга, от которых отходят каудальные соединительные артерии [52, 224].

Виллизиев круг головного мозга крыс представляет собой сосудистое

кольцо, которое образовано внутренними сонными, ростральными и каудальными мозговыми артериями, ростральными и каудальными соединительными артериями [52, 222]. В 75 % случаев у крыс встречается замкнутый виллизиев круг. В таких случаях назальные соединительные артерии соединяются тонкой постхиазматической ветвью впереди перекреста зрительных нервов. В 25 % случаев виллизиев круг незамкнут, в 50 % случаев виллизиев круг головного мозга крысы имеет форму восьмерки, что обусловлено наличием дополнительной соединительной артерии, которая разделяет сосудистое кольцо на два кольца разного диаметра (кольцо с большим диаметром краниальное, с меньшим – каудальное). Суммарный калибр внутренней сонной артерии у крысы превышает диаметр базилярной артерии в 2,4 раза, что говорит о приоритетной роли внутренней сонной артерии в кровоснабжении головного мозга и является сходством в кровоснабжении головного мозга человека [76]. Артериальный круг крысы имеет сходства по анатомическому строению с виллизиевым кругом человека. Например, назальные соединительные артерии являются аналогом передним мозговым артериям человека, постхиазматическая ветвь сходна с передней соединительной артерией, а каудальные соединительные артерии виллизиева круга крыс подобны задним соединительным, каудальные мозговые артерии соответствуют задним мозговым артериям артериального круга человека [85, 222]. Знание сравнительно-морфологических особенностей и анатомии артериального круга у крыс необходимо для моделирования патологии головного мозга сосудистого генеза и возможности экстраполяции полученных результатов на человека.

Согласно литературным данным, хорошо изучено влияние ишемии на структурно-функциональное состояние нейронов неокортекса при разных экспериментальных моделях [5, 6, 17, 48, 68, 204]. В результате возникшей сосудистой гипоксии в первую очередь реагируют наиболее молодые филогенетические структуры – кора больших полушарий. Длительная непрерывная гипоксия является одной из главных причин гибели клеток мозга. Запуск «ишемического каскада» происходит в результате критического снижения

кислорода в нервной ткани, что приводит к уменьшению скорости аэробного окисления в митохондриях, падению концентрации АТФ и нарушению клеточного метаболизма [10, 32].

При ишемии головного мозга нейроны претерпевают морфофункциональные изменения, которые являются проявлением повреждения, регенерации и адаптации в условиях ишемии. Изменения затрагивают размеры (уменьшение и увеличение) и форму нейронов (треугольная, вытянутая, веретенovidная), степень хромофилии цитоплазмы и ядра [10]. Появляются патологически измененные формы нейронов – гиперхромные без и со сморщиванием, гипохромные нейроны и клетки-тени [50, 138, 156, 240].

По данным литературы, следствием ишемии являются признаки дистрофии, атрофии, апоптоза и некроза (колликвационного и коагуляционного), гиперплазии и гипертрофии [22, 112, 132, 207, 241]. Изменения структурных элементов головного мозга (прежде всего нейронов) при ишемии носят обратимый и необратимый характер. При обратимых прижизненных изменениях нейронов при ишемии отмечается уплотнение тела нейрона без признаков грубой деструкции структурных элементов. На начальных стадиях необратимых изменений нейронов при ишемии наблюдается тигролиз, как признак исчезновения РНК и протеина цитоплазмы нейрона. Тигролиз наблюдается через 20 мин после 4 мин остановки кровотока. Затем обнаруживается уменьшение объема цитоплазмы и ядра, изменяется форма перикариона до треугольной. В цитоплазме нейрона вакуализация, сначала по периферии с последующим распространением на всю цитоплазму, дендриты и аксон. Небольшие по размеру вакуоли могут сливаться, образуют большие вакуоли. Для необратимых изменений нейронов при ишемии характерен следующий комплекс: гиперхроматоз ядра и цитоплазмы, тигролиз и вакуализация цитоплазмы, выявляемые при исследовании препаратов, окрашенных тионином по методу Ниссля, эозинофилия цитоплазмы при окраске гематоксилин-эозином («острая эозинофильная дегенерация нейронов», «коагуляционный некроз» или «красные мертвые нейроны»). Для таких нейронов характерно уменьшение тела нейрона в объеме и изменение его формы до

веретенной (гиперхромные сморщенные или пикноморфные нейроны) [22, 28, 75, 169]. Характерным признаком сморщивания нейронов является уменьшение перикариона в размере, гиперхроматоз ядра и цитоплазмы. Возможно пикноморфное набухание на начальных этапах, но, как правило, нейрон с самого начала уменьшается в размере, боковые и базальная поверхность перикариона западают [26]. К ишемическому изменению нейронов относится так называемое гомогенизирующее изменение или гомогенизирующий некроз. Клетка приобретает шаровидную форму, характерно бледное окрашивание цитоплазмы при окраске тионином по методу Ниссля, уменьшенное в размере ядро, часто наблюдается в клетках коры больших полушарий [22, 26, 75].

Гипохромные нейроны при ишемии головного мозга могут рассматриваться, как состояние нейронов в периоде относительного покоя, во время которого происходит восстановление (регенерация) структур [64]. Также гипохромия может быть рассмотрена как признак деструктивных процессов, происходящих в нейроне. В таких случаях наблюдается постепенное растворение тигроида, процесс начинается с распыления тигроида с последующим его расплавлением. Цитоплазма таких нейронов приобретает бледно-голубой цвет и гомогенный вид. Ядро гипохромного нейрона светлое, возможно увеличение его в объеме и эксцентричное расположение. Вышеперечисленные проявления могут быть признаком острого набухания нейрона в условиях ишемии [26].

Астроциты принимают участие в регуляции активности нейронов и уровня кровотока, благодаря способности изменять диаметр кровеносных сосудов. После ишемии головного мозга астроциты способствуют адаптации и восстановлению утраченных функций поврежденными нейронами [34].

Микроглиоциты выполняют функцию иммунной защиты и являются основным компонентом собственной иммунной системы головного мозга. При ишемическом повреждении микроглиоциты мигрируют и поглощают необратимо поврежденные нейроны и глиальные клетки [17]. Также микроглиоцитам принадлежит роль обеспечения нейропластических процессов в поврежденном мозге [101].

По данным литературы, защиту нейронов и восстановление нервной ткани после повреждения, в том числе и ишемического, обеспечивают сложные функционально специализированные клеточные системы, к которым относятся нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга. Реакция и исход восстановления нервной ткани зависит от продолжительности и степени тяжести ишемического воздействия. В этой связи одновременное исследование нейронов и глиальных клеток после необратимой двусторонней ПОСА является перспективным и имеет большое значение для детализации патогенеза ишемического повреждения головного мозга, а также компенсаторно-восстановительных процессов при ишемии [84, 187, 232].

1.2 Необратимая двусторонняя перевязка общих сонных артерий, как модель гипоперфузии головного мозга

Ишемическое повреждение головного мозга имеет разные патогенетические варианты, в связи с чем требуется тщательный подход к выбору экспериментальной модели [9, 151, 228].

В настоящее время цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) занимают лидирующую позицию в структуре инвалидизации и смертности населения [57]. В связи с чем ЦВЗ актуальны для научно-прикладной и практической медицины. Церебральная ишемия представляет собой тяжелое нейродегенеративное состояние, которое, в зависимости от вовлеченной в патологический процесс области, может препятствовать реализации когнитивных и сенсомоторных функций центральной нервной системы. Даже кратковременная ишемия головного мозга ведет к его глубоким повреждениям. Снижение гемоперфузии головного мозга является наиболее частой причиной хронических заболеваний головного мозга и приводит к морфологическим и функциональным изменениям [3]. Хроническая гипоперфузия головного мозга возникает в результате длительной недостаточности его кровоснабжения [36]. Частым исходом хронической гипоперфузии становится сосудистая деменция, которая занимает

значительную долю в структуре инвалидности населения и является медицинской и социально-значимой проблемой [70]. Однако точные патофизиологические механизмы, лежащие в основе сосудистой деменции, остаются неясными, несмотря на обширные исследования [151].

Традиционной моделью гипоперфузии головного мозга является необратимая двусторонняя перевязка общих сонных артерий у крыс. Повреждение нейронов слоев III и V неокортекса, как высокочувствительных к ишемии отделов головного мозга, имеет диффузный характер [45, 117, 228]. Модель необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий, которая использовалась в качестве экспериментальной модели хронической гипоперфузии, в первую очередь характеризуется острой и тяжелой гипоперфузией, приводящей к быстрому сосудистому ответу и ишемическим поражениям, особенно затрагивающим подкорковые области и полосатое тело, мозолистое тело и префронтальную кору. Острый гемодинамический компенсаторный ответ приводит к постепенному выздоровлению и в долгосрочной перспективе к умеренной гипоперфузии. Компенсаторные реакции, запускаемые во время этой острой и наиболее тяжелой фазы гипоперфузии (1 день), являются основными факторами, определяющими долгосрочный результат как с точки зрения объема поражения, расширения, восстановления, так и атрофии головного мозга.

Выбор крысы в качестве экспериментального животного обусловлен особенностями анатомического строения виллизиева круга крысы и сходством его морфофункционального значения с артериальным кругом человека [76, 222].

Согласно литературным данным, после необратимой двусторонней ПОСА отмечено изменение мозгового кровотока. Через 1–3 сутки после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий отмечено снижение мозгового кровотока в неокортексе до 30–50 % от контрольных значений. Через 3–8 сут после операции отмечено постепенное восстановление мозгового кровотока, однако, через 4 недели после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий уровень церебрального кровотока остается ниже контрольных значений

[123, 194, 206]. Что создает умеренные гипоксически-ишемические состояния, которые очень напоминают снижение церебрального кровотока при деменции человека [203].

Таким образом, адекватной моделью хронической гипоперфузии головного мозга является необратимая двусторонняя перевязка общих сонных артерий у крыс. С помощью этой модели представляется возможным детальное изучение морфологических изменений нейронов, межнейронных контактов и глиальных клеток в условиях ишемии.

1.3 Закономерности синхронных проявлений реорганизации нейронов и глиальных клеток в компенсаторно-восстановительных процессах нервной ткани при ишемии

Актуальным направлением в настоящее время является одновременное изучение реорганизации нейронов, астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов в компенсаторно-восстановительных процессах при ишемии [106, 176, 205, 234]. Согласно литературным данным, в восстановлении нервной ткани при повреждении, в том числе ишемическом, принимают участие структурно-функциональные системы – нейро-глио-сосудистые микроструктурные комплексы, которые состоят из нейронов, глиальных клеток, перицитов и эндотелиоцитов [13, 235].

Астроциты головного мозга участвуют во многих аспектах функционирования мозга, включая поддержание гомеостаза, развитие синапсов, поддержку нейронов, регуляцию мозгового кровотока, формирование и функцию ГЭБ и контроль нейротрансмиттеров [147]. Одной из важных функций астроцитов является обеспечение нейронов лактатом посредством процесса анаэробного гликолиза [177]. Регуляция функции синапсов обеспечивается выделением астроцитами глиотрансмиттеров, которые поступают в межклеточное пространство. К трансмиттерам, выделяемым астроцитами, относятся: аминокислоты (D-серин, глутамат), нуклеотиды (аденозинтрифосфорная кислота

– АТФ) и пептиды (предсердный натрийуретический фактор) [189]. Астроцит может взаимодействовать с большим числом синапсов, тем самым активирует большие популяции нейронов. В качестве ведущего глиотрансмиттера выступает глутамат, он активирует рецепторы NMDA, AMPA с целью быстрого обеспечения сигнала. Тем самым астроцит принимает участие в пластической регуляции синаптических процессов [21]. Установлено, что морфология астроцитов влияет не только на пространственные отношения с нейронами, но и с олигодендроцитами, сосудистыми клетками и другими астроцитами [195]. Регуляция водно-электролитного гомеостаза в головном мозге астроцитами осуществляется посредством мембранного канала аквапарина-4 в ножках астроцитов [211].

Любое, в том числе и ишемическое, повреждение головного мозга затрагивает астроциты. Установлено наличие прямой зависимости между степенью и характером морфологических изменений нейронов и астроцитов [29]. Функция астроцитов при повреждении головного мозга определяется степенью повреждения нейронов [53]. Эффекты при активации астроглии двулики и могут быть направлены на защиту страдающей ткани головного мозга или на деструкцию поврежденных нейронов и стать причиной необратимых повреждений [123, 198]. Нарушение функции астроцитов в условиях повреждения головного мозга является результатом окислительного стресса, деструкции митохондрий, нейровоспаления и глутаматной токсичности [21]. Выделяют 3 функциональных типа активированных астроцитов: классический (интактный), провоспалительный и защитный противовоспалительный тип. Провоспалительный тип активированного астроцита приводит к патологии нейронов [147]. Сигнал астроциты получают от патологически измененных нейронов и в зависимости от времени воздействия или характера повреждающего фактора астроцит либо усугубляет деструкцию нервной ткани, либо способствует защите поврежденных клеток [21, 198].

Согласно данным литературы, в острой фазе инсульта поврежденные клетки очага и полутени выделяют цитокины, в том числе трансформирующий фактор

роста (TGF)- α , цилиарный нейротрофический фактор, IL-1, IL-6 и калликреин-родственную пептидазу [184, 223]. В ответ на это возникает реактивный астроглиоз в периинфарктной области и формируется глиальный рубец для поддержания гомеостаза ЦНС и ограждения очага поражения [110]. Отличительными признаками реактивного астроглиоза являются гипертрофия астроцитов и гиперэкспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) [98]. После реактивного астроглиоза астроциты продуцируют и высвобождают провоспалительные медиаторы, такие как IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β и IFN γ , а также свободные радикалы, такие как NO, супероксид и пероксинитрит.100). Напротив, пролиферация астроцитов и образование глиальных рубцов ограничивают распространение нейровоспаления [98].

Установлено, что в остром периоде ишемии происходит отек тела и отростков астроцитов, компенсаторная гиперплазия и гипертрофия с удлинением и утолщением отростков, пролиферация астроцитов и усиление экспрессии GFAP [101, 197]. После 20-мин окклюзии общих сонных артерий (ООСА) в СМК головного мозга крыс на фоне мелкоочаговых обратимых ишемических изменений нейронов уже через 1 и 3 сут после ООСА происходило увеличение содержания реактивных гипертрофированных астроцитов, а нейроглиальные отношения первые 14 сут после ООСА характеризовались увеличением НГИ в 1,2–2,0 раза в сравнении с 1 сут. Увеличение относительной площади GFAP-позитивного материала в экспериментальной модели неполной глобальной ишемии путем ООСА отмечено на протяжении всего исследуемого периода (30 сут). Пространственная организация отростков астроцитов при данной модели характеризовалась увеличением заполнения фрактального пространства СМК через 3 сут с восстановлением фрактальной размерности и лакунарности через 30 сут после ООСА до контрольных значений. Вышеперечисленные проявления свидетельствуют об активации естественных защитных функций астроцитов для восстановления и утилизации поврежденных нейронов [62].

Микроглия и астроциты являются основными компонентами врожденной иммунной системы головного мозга. Было обнаружено, что активация микроглии

может индуцировать A1-реактивные астроциты путем высвобождения трех цитокинов: IL1 α , TNF α и субъединицы компонента комплемента Iq (C1q) [170]. Астроциты A1 впоследствии способствуют повреждению нейронов. Исследования [238] показали, что ингибирование активации микроглии и поляризации M1 агонистами рецептора глюкокопептида-1 может эффективно ингибировать превращение в астроциты A1, тем самым оказывая нейропротекторное действие при болезни Паркинсона. Кроме того, недавние исследования показали, что высвобождение фрагментированных и дисфункциональных митохондрий микроглии также способно запускать астроцитарный ответ A1 [153]. Микроглия взаимодействует с несколькими типами клеток в ЦНС и регулирует многочисленные процессы развития и функционирования, включая сокращение синапсов и клиренс апоптотических нейронов [85]. Микроглия, астроциты, олигодендроциты при инсульте индуцируются активированной микроглией, клеточные и молекулярные основы индукции A2 остаются неясными [170]. Необходимо провести дальнейшие исследования взаимосвязи между астроцитами A2 и микроглией. Кроме того, астроциты также оказывают регулирующее влияние на микроглию. Например, исследования показали, что IL-33, полученный из астроцитов, может служить реостатом, тем самым помогая настроить поглощение микроглиального синапса во время созревания и ремоделирования нервной цепи.

Микроглия уничтожает микроорганизмы, погибшие нейроны и глиальные клетки, поврежденные синапсы, белковые агрегаты и другие частицы, которые могут представлять опасность для нервной ткани. Кроме того, микроглия секретирует различные факторы, которые необходимы для иммунного ответа и восстановления нервной ткани [113]. Микроглиальные клетки являются первыми иммунными клетками, чувствительными к ишемическому воздействию, и немедленно реагируют [163]. При активации микроглии в перинфарктной зоне в период от 30 мин до 1 ч после окклюзии средней мозговой артерии (МСаО) повышается активность маркеров CD11b, CD45 и IBA1 [111, 142]. Этот статус активации микроглии после МСаО может сохраняться в течение нескольких

недель [118]. Наряду с активацией происходят некоторые изменения фенотипа микроглии, которые можно кратко классифицировать на повреждающий или восстанавливающий тип, а именно M1 или M2 соответственно [111, 208]. Этот процесс называется поляризацией микроглии, с временным признаком, динамически меняющимся в течение патологического процесса инсульта [208]. Принято считать, что в острой стадии (в течение 1 сут) пролиферация и активация микроглии вызывают сильную воспалительную реакцию, наносящую ущерб нервной ткани, тогда как в хронической стадии (через несколько дней после начала заболевания) микроглия может вызывать различные защитные цитокины, такие как нейротрофический фактор IGF1, который способствует восстановлению и выживанию нейронов после ишемического повреждения [162]. Кроме того, микроглия активно взаимодействует с другими клетками ЦНС. Эти факты свидетельствуют об их важности и сложности в патогенезе инсульта. Активация микроглии является первым этапом воспалительной реакции после ишемического повреждения головного мозга [188]. При возникновении ишемии не активированная микроглия быстро мобилизуется к месту повреждения, где претерпевает морфологические изменения, соответствующие снижению мозгового кровотока и энергетической депривации (обычно проявляющейся в виде гипертрофии тела клетки) [191, 217]. Эти морфологические изменения тесно связаны с функцией активированной микроглии [149, 227].

Поляризация – это процесс, посредством которого макрофаги принимают разные фенотипы в зависимости от степени и времени воздействия повреждающего фактора [102, 127]. Основанием для различения микроглии M1 и M2 является их биологическая функция, а также секретируемые цитокины и хемокины. Микроглия M1 обычно обладает антигенпрезентирующим и убивающим действием и секретирует различные воспалительные процессы. Связь между дифференцировкой M1 и M2 и прогрессированием заболевания различается для разных заболеваний. Ху и др. [139], которые использовали модель транзиторной фокальной ишемии для выявления динамических изменений поляризации микроглии, сообщили о дифференциальном сдвиге от фенотипа M2

к фенотипу M1 при церебральной ишемии. Вскоре после ишемического повреждения большая часть микроглии мигрировала или инфильтрировала области инфаркта, проявляя фенотип M2, что представляло собой эндогенную попытку очистить ишемическую ткань и ограничить повреждение головного мозга. Однако количество микроглии M2 постепенно уменьшалось в течение 7 дней, и, следовательно, микроглия M1 стала преобладать в поврежденной области. Это открытие способствует возможности эффективно определять возможные методы вмешательства и оптимальные сроки вмешательства после ишемического инсульта.

Микроглия быстро активируется после ишемического инсульта, как описано ранее. Однако роль микроглиальных клеток в условиях ишемии двудлика, поскольку в разные периоды ишемии они имеют разные и иногда противоположные функции. В острой фазе активированная микроглия секретирует ряд воспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухоли (ФНО), ИЛ-1 β и ИЛ-6 [163], которые способствуют сильной воспалительной реакции. Исследователи сообщили, что после МСАО инфильтрирующие макрофаги также являются источником воспалительных факторов [239]. Роль макрофагов и микроглии при инсульте во многих аспектах одинакова и поэтому часто описывается как микроглия/ макрофаг. Однако типы основных воспалительных факторов, продуцируемых микроглией и макрофагами, различны: первые продуцируют относительно более высокие уровни активных форм кислорода (АФК) и TNF- α , тогда как вторые продуцируют более высокие уровни ИЛ-1 β [198]. Воспалительная реакция, вызванная факторами воспаления, секретируемыми этими клетками, является отличительной чертой острой стадии ишемического инсульта. Обычно считается, что в острой фазе тяжелая воспалительная реакция, подобная этой, отрицательно коррелирует с прогнозом [107, 131]. Поэтому назначение противовоспалительных препаратов в острой стадии имеет важное значение. После острой фазы ишемического инсульта воспалительная реакция постепенно снижается, и ишемический инсульт вступает в другую стадию, во время которой в области инфаркта преобладает

восстановление тканей [136]. На этом этапе микроглия функционирует как «ремонтник». Восстановление тканей после инсульта зависит от нейрогенеза для замены поврежденных клеток. Было высказано предположение, что микроглия активно модулирует нейрогенез, направляя миграцию клеток и влияя на синаптическую активность, регулируя количество функциональных синапсов в нервной ткани [148]. Стоит отметить, что микроглия может оказывать противоречивое влияние на нейрогенез через 2 и 16 недель после инсульта. Поэтому необходимы исследования с более длительным временем наблюдения и несколькими временными точками, чтобы выяснить, когда и как микроглия влияет на нейрогенез [176]. Микроглия является основным фагоцитом в ЦНС.

Олигодендроциты играют важную метаболическую роль в головном мозге. Метаболическая поддержка аксонов имеет важное значение, и ее дисфункция может быть связана со многими неврологическими расстройствами, включая ишемию [16, 165, 166]. Основной функцией олигодендроцитов является образование миелина. Миелин составляет примерно 70 % сухой массы ЦНС млекопитающих [210] и имеет решающее значение для поддержания проводимости электрического импульса и максимизации его скорости. Миелиновые оболочки расположены сегментами, разделенными перехватами Ранвье, где натриевые каналы сгруппированы с высокой плотностью в мембране аксона, так что они могут генерировать потенциалы действия [230]. Миелин покрывает и маскирует межузловые части аксона, которые содержат меньше натриевых каналов и более высокую плотность калиевых каналов, которые, как правило, препятствуют генерации потенциалов действия [230]. Миелинизация приводит к образованию аксонов с высоким сопротивлением и низкой емкостью, увеличивая скорость электрической проводимости и улучшая ее метаболическую эффективность, тем самым оптимизируя использование пространства и энергии. Обнаружено, что влияние микроглии на олигодендроциты играет решающую роль в ремиелинизации после инсульта. Исследователи продемонстрировали, что воспалительные факторы, продуцируемые активированной микроглией, нарушают работу олигодендроцитов. [114]. В модели МСАО нейровоспаление,

опосредованное TNF, MMP3 и MMP9, является важным фактором повреждения белого вещества и апоптоза олигодендроцитов [144, 236]. Однако, фактор роста эндотелия сосудов С (VEGFC), продуцируемый микроглией после ишемии, стимулирует пролиферацию ОДЦ через рецептор VEGFR-3 [91]. Это открытие подразумевает, что микроглия может играть двойную роль в регуляции олигодендроцитов. Исследования также показали, что преобразование микроглии М1 в фенотип М2 связано с ремиелинизацией. Микроглия М2, которая действует как защитные клетки после инсульта, может управлять дифференцировкой олигодендроцитов во время ремиелинизации, что является важной частью эффективного ответа на ремиелинизацию [184]. Фактически микроглия играет важную роль не только при патологических состояниях, но и в гомеостатической регуляции ОДЦ при развитии ЦНС [130]. Необходимы дальнейшие исследования для изучения специфического механизма микроглии, лежащей в основе олигодендроцитов на разных стадиях после необратимой двусторонней ПОСА.

Результатом ишемического повреждения головного мозга является включение быстрого патофизиологического каскада. Этот каскад включает гомеостатическую дисфункцию внутриклеточного кальция и постоянную потерю глутаминовой кислоты, за которой следует продукция свободных радикалов, развитие воспаления, активация апоптотических генов и дисфункциональный энергетический обмен. Эти изменения могут спровоцировать апоптоз или некроз, что приводит к ишемическому повреждению нейронов [108]. Известно, что в процессе ишемического повреждения головного мозга также принимают участие астроциты, микроглиоциты и эндотелиальные клетки микрососудов головного мозга, которые поддерживают нейроны, проводят сложные и специфические сигналы и в совокупности выполняют ишемический каскад после очаговой церебральной ишемии [238]. В связи с этим предложена концепция нейроваскулярной единицы (НВЕ) для интегративного исследования патогенеза церебральной ишемического повреждения с целью открытия и разработки более эффективных методов диагностики и стратегий лечения. [239].

Нейроваскулярная единица объединяет все клеточные и внеклеточные

компоненты, которые ответственны за поддержание гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), церебральный гомеостаз, а также контроль мозгового кровотока [81]. Нейроваскулярная единица включает в себя: нейроны, астроциты, эндотелиальные клетки (ЭК), перициты (ПК), микроглию и базальную мембрану. Каждый компонент взаимосвязан друг с другом, создавая анатомическое и функциональное целое, что приводит к эффективной системе церебрального гомеостаза и регуляции кровотока [84, 89].

Большинство исследований церебрального ишемического повреждения были сосредоточены в основном на нейронах или использовании различных групп клеток и структур, отделенных от мозга [6]. Согласно данным Claudia Alia и соавторов [84], синхронная реорганизация астроцитов, микроглиоцитов, эндотелиоцитов и нейронов при ишемическом повреждении головного мозга влияет на исход ишемического повреждения, также установлено, что во время церебрального ишемического повреждения эти четыре компонента НВЕ могут динамически реагировать на ишемические состояния, изменять свою морфологию и/или функции и контролировать открытие/закрытие проводящих путей посредством высвобождения различных влияющих факторов. Структуры НВЕ работают одновременно, воздействуя на ишемическое повреждение. В связи с этим, перспективным направлением в нейроморфологии для понимания основ защиты и восстановления головного мозга при ишемическом повреждении является изучение однонаправленной реорганизации интегрированных нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов СМК в условиях ишемии.

Согласно литературным данным, существует метаболическая зависимость между нейронами и глиальными клетками с одной стороны, глиальными клетками и эндотелиальными клетками с другой стороны [140, 210]. Границей между нейроглиальным компартментом и сосудистым компартментом являются периваскулярные части отростков глиальных клеток, образующие глиальную ограничивающую мембрану. В настоящее время общепризнано, что астроциты играют решающую роль не только в поддержании барьерных свойств эндотелиальных клеток микрокапилляров головного мозга [232], но и в контроле

мозгового кровотока [217, 233].

Установлено, что три основных компонента НВЕ – нейроны, глия и эндотелиоциты – проявляют различную устойчивость к ишемическим состояниям и различное участие в метаболических процессах. Они также играют различную роль в иммунных реакциях на патологические процессы в головном мозге, что может значительно улучшить диагностику инсульта [215]. Считается, что нервно-сосудистая связь осуществляется через высвобождаемую активированными нейронами глутаминовую кислоту [124], что приводит к активации АС, перicyтов и других нейронов, стимулируя выделение вазоактивных медиаторов. Баланс вазоконстрикции и вазодилатации контролирует напряжение окружающих сосудов и регулирует локальный мозговой кровоток [134]. После инсульта поврежденные эндотелиальные клетки могут высвобождать провоспалительные факторы из-за увеличения проницаемости ГЭБ, что приводит к активации AS и MG. В процессе восстановления ГЭБ и ремоделирования паренхимы после инсульта клетки НВЕ стимулируют друг друга и приводят к высвобождению факторов роста (например, фактора роста нервов, фактора роста эндотелия сосудов, инсулиноподобного фактора роста) и, следовательно, помогают восстановить мозг после инсульта. Кроме того, MG также высвобождает IL-10, который действует на реактивный АС, вызывая переход от повреждающего фенотипа до фенотипа восстановления нейронов в условиях ишемии, что подтверждает связь микроглиальных клеток и астроцитов [191]. Некоторые исследования показали, что определенные сигнальные факторы коррелируют с функцией НВЕ. Например, хемокины, экспрессируемые в нейронах, глиальных и эндотелиальных клетках, играют важную роль в двунаправленных реакциях между паренхиматозными клетками и тем самым принимают участие в функционировании мозга, поддержании гомеостаза, способствуют коммуникации между нейронами и глией и, таким образом, уменьшают повреждение головного мозга [239].

Острый ответ астроцитов сопровождается морфологическими изменениями, связанными с увеличением экспрессии белка GFAP – реактивный астроглиоз [95,

180]. Эти динамические изменения реактивных астроцитов были измерены R. G. Mestriner, где авторы использовали иммуногистохимическое исследование для определения белка GFAP в области полутени через 30 дней после ишемического и геморрагического инсульта у крыс. Результаты показали повышенную плотность GFAP-позитивных астроцитов после инсульта и пространственную реорганизацию отростков астроцитов, проявляемую изменением количества и длины разветвлений, по сравнению с контрольной группой [180]. Аналогичный анализ был проведен D. C. Wagner, где исследовали реактивный глиоз через 4 дня после окклюзии средней мозговой артерии у крыс со спонтанной гипертензией. Измерение окрашивания GFAP в нескольких областях мозга показало, что в полутеновой области объем, диаметр, длина и разветвленность отростков реактивных астроцитов были увеличены по сравнению с астроцитами в контралатеральном полушарии и в удаленных от ишемического ядра областях. Эти данные указывают на регионализацию реактивного глиоза в зависимости от расстояния от места повреждения головного мозга [224]. По результатам исследования L. Nailong, при экспериментальной модели ишемии головного мозга, вызванной фототромбозом, через два дня после начала эксперимента уровень GFAP значительно повысился, и появилось гораздо больше GFAP-позитивных астроцитов по сравнению с контрольными мышами. Плотность GFAP-позитивных астроцитов достигала максимальных значений на 4-й день с сохранением на высоком уровне до 14-го дня после фототромбоза. Также наблюдалось небольшое увеличение GFAP-позитивных астроцитов в контралатеральном полушарии в те же исследуемые сроки [167]. В исследовании Min Kyung Song и соавторов [213] установлено, что после необратимой двусторонней ПОСА в моторной коре головного мозга крыс происходит активация астроцитов, которая может сохраняться на протяжении 4 недель после необратимой двусторонней ПОСА для восстановления поврежденных нейронов. Также установлено, что происходит разрушение кровеносных сосудов, характеризующееся уменьшением длины и увеличением количества фрагментированных микрососудов в моторной коре и гиппокампе CA₁ [213].

Однако, необходимо более детально изучить действие активированных астроцитов на другие компоненты НВЕ и исход ишемического повреждения СМК после неоратимой двусторонней ПОСА.

По результатам исследования В. В. Криштоп [40], при субтотальной ишемии головного мозга, полученной при полной необратимой одномоментной билатеральной перевязке общей сонной артерии у крыс, в неокортексе адаптация церебральной гипоперфузии происходила стадийно. На первой стадии преобладали явления поражения нейронов, проявляющиеся ростом численной плотности необратимо измененных нейронов и гибелью клеток (через 1, 6 и 8 сут после ПОСА). При этом происходило увеличение в размере нейронов с обратимыми изменениями и снижение их численной плотности. На второй стадии происходила стабилизация показателей, характеризующих повреждение коры больших полушарий головного мозга (2-я и 3-я неделя после начала эксперимента). На третьей стадии происходило приближение нейронов к сосудам гемокциркуляторного русла, увеличение количества сателлитных глиоцитов и погружение их в цитоплазму нейронов, что свидетельствовало о развитии неполной адаптации нервной ткани в условиях ишемии (4-я и 5-я неделя после ПОСА). Через 1 сут после ПОСА отмечались изменения микроциркуляторного русла, проявляющиеся изменением сосудистой проницаемости, приводящее к плазморрагии и отеку. Отмечался отек периартериолярных астроцитов, при этом просвет ряда артериол был резко сужен. Через 7 сут на фоне сохраняющегося периваскулярного отека появлялись митотически делящиеся клетки, увеличивалась численная плотность олигодендроцитов и протоплазматических астроцитов, а через 14 сут после полной необратимой одномоментной билатеральной ПОСА выявлялись новообразованные гемокпилляры, реактивные изменения макроглии достигали максимальных значений. Через 21 сут отмечалась перестройка капиллярной сети, проявляющаяся запустеванием и склеиванием некоторых капилляров [39, 40]. Полученные В. В. Криштоп результаты свидетельствуют об изменениях, происходящих отдельно в нейронах, глиальных клетках и микрососудистом русле СМК, однако, мало данных об

однонаправленной реорганизации интегрированных нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов СМК в условиях субтотальной ишемии и требуется более детальное изучение.

Согласно литературным данным, при сравнительном анализе гистологических нарушений теменной коры в условиях субтотальной (двусторонняя перевязка общей сонной артерии) и тотальной ишемии (декапитация) головного мозга, выявленные изменения нейронов при субтотальной ишемии аналогичны таковым при тотальной ишемии, однако, после декапитации численная плотность пикноморфных нейронов была на 80 % больше, чем после двусторонней перевязки общей сонной артерии, а большую долю клеточной популяции составили нейроны с перичеллюлярным отеком. Нормохромные нейроны в условиях тотальной ишемии отсутствовали [6]. Согласно полученным результатам Е. И. Бонь, в условиях субтотальной ишемии нейроны были менее подвержены деструктивным процессам, чем при тотальной ишемии. Какие именно процессы способствовали сохранению и восстановлению нейронов в условиях субтотальной ишемии после ПОСА подлежит более детальному изучению.

При 40 мин окклюзии общих сонных артерий (ООСА) в слое III и слое V СМК появлялись гиперхромные нейроны с признаками их прижизненных дегенеративных изменений. В зонах дегенеративных изменений нейронов увеличивалась численная плотность астроцитов, микроглиоцитов и олигодендроцитов. Дегенеративно измененные нейроны имели разную степень дегидратации перикариона, деструкции его элементов, гидропической дистрофии. В нервной ткани в условиях ишемии после 40 мин ООСА основной объем зон отека-набухания отмечался в нейропиле (дендриты, синапсы, отростки астроцитов) и микрососудами (отростки астроцитов). Отмечалась реорганизация глиальных клеток. Так, через 1 сут после ООСА отмечалось увеличение доли активных форм микроглиоцитов с целью санации нервной ткани. Через 7 сут после ООСА увеличивалось содержание олигодендроцитов, что необходимо для структурно-функционального восстановления нервной ткани в условиях ишемии

[75]. Однако при данной модели субтотальной ишемии головного мозга присутствует реперфузия, которая может приводить к вторичному повреждению нервной ткани. Момент реперфузии нехарактерен для необратимой двусторонней ПОСА, что может говорить о вариабельности происходящих изменений в условиях субтотальной ишемии головного мозга и требует дальнейшего изучения в аспекте синхронных проявлений реорганизации нейронов и глиальных клеток в компенсаторно-восстановительных процессах нервной ткани при ПОСА.

Таким образом, установлена двоякая роль глиальных клеток в условиях ишемии. Эффекты от активации глиальных клеток зависят от степени и времени воздействия ишемии на нервную ткань. Основным трендом стало изучение однонаправленной реорганизации интегрированных нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов для понимания основ защиты и восстановления головного мозга в условиях ишемического повреждения. Новая концепция изучения реакции нервной ткани на повреждение связана с тем, что ишемическое повреждение нервной ткани одновременно затрагивает широкий спектр межклеточных взаимодействий, показано, что структуры НВЕ имеют общее влияние на исход ишемического повреждения головного мозга. В связи с этим актуальным направлением нейроморфологии является одновременное изучение нейронов, астроцитов, олигодендроцитов, микроглиоцитов и микрососудистого русла для более детального изучения механизмов повреждения и восстановления нервной ткани, эти знания будут являться отправной точкой для проверки узконаправленных терапевтических стратегий для более полного восстановления функционального исхода после ишемического повреждения [189, 213, 224, 233, 239]. Согласно данным литературы, изучена реакция нейронов и глиальных клеток СМК при разных патогенетических вариантах церебральной ишемии в эксперименте [5, 6, 40, 74]. Однако структурные особенности синхронных проявлений реорганизации нейронов и глиальных клеток при необратимой двусторонней ПОСА раскрыты не полностью и подлежат более детальному изучению.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Дизайн экспериментального исследования представлен на рисунке 4, описание методов морфометрического исследования – в таблице 1.

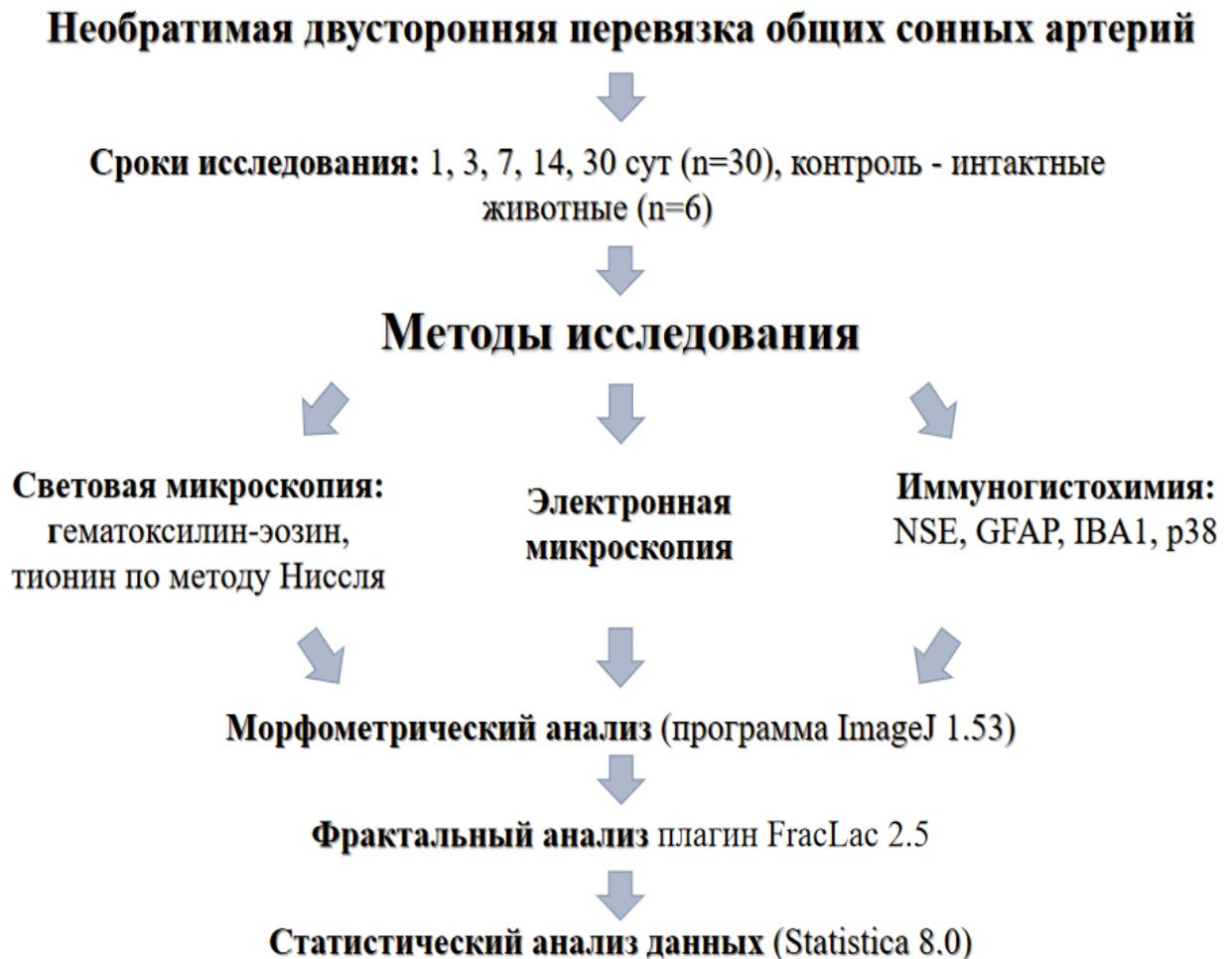


Рисунок 4 – Дизайн исследования

Таблица 1 –характеристика морфометрических методов исследования

Метод исследования	Характеристика метода	Цель метода
<i>Световая микроскопия</i>		
Гематоксилин-эозин	Базофильно окрашенные структуры содержат нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), локализуются в клеточном ядре, богатых РНК участках цитоплазмы. Эозинофильные структуры – цитоплазматические и внеклеточные белки	Общая оценка нервной ткани, выявление ишемического изменения нейронов в виде резко выраженной эозинофилии их цитоплазмы
Тионином по методу Ниссля	Нуклеопротеиды ядра и цитоплазмы клеток интенсивно удерживают тионин (окрашенный клеточный материал резко выделяется на бесцветном фоне нейропиля)	Оценка состояния нейронов и глиальных клеток, выявление комплекса патологических изменений нейронов, в т. ч. их ишемическое изменение, а также изменения астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов

Продолжение таблицы 1

<i>Иммуногистохимические методы</i>		
NSE (нейронспецифическая енолаза)	Нейрон-специфическая енолаза является высокоспецифичным нейромаркером. Енолаза катализирует дегидратацию 2-фосфо-D-глицерата (PGA) до фосфоенолпирувата (PEP) в гликолитическом пути. Этот фермент необходим для анаэробного превращения глюкозы в метаболиты, пригодные для окисления	Оценка морфофункционального состояния всех типов нейронов, степени интенсивности гликолиза
GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок)	Мономерный белок цитоскелета, присутствующий в астроцитах	Оценка морфофункционального состояния астроцитов
IВA1 (кальций-связывающий белок, специфичный для астроцитов)	Белок, специфичный для микроглиоцитов. Экспрессия увеличивается при активации микроглиальных клеток	Оценка морфофункционального состояния микроглиальных клеток
p38 (синаптофизин)	Гликопротеин p38 вовлечен в процесс экзоцитоза синаптических пузырьков, присутствует исключительно в пресинаптических терминалях	Оценка синаптической плотности или количества нервных терминалей

2.2 Объект и предмет исследования

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, одобрена этическим комитетом университета (протокол № 123 от 09.10.2020). В качестве экспериментальных животных использовали белых крыс линии Wistar массой 250–300 г. 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».

Неполную глобальную ишемию головного мозга моделировали путём необратимой двусторонней перевязки общей сонной артерии (2-сосудистая модель неполной глобальной ишемии, без гипотонии) (Рисунок 5).

Эксперимент проведен на самцах белых крыс линии Wistar ($n = 36$). Забор материала проводили через 1, 3, 7, 14 и 30 сут ($n = 30$) после ПОСА. Контролем служили интактные крысы ($n = 6$).

Экспериментальная модель. Проведена премедикация (сульфат атропина 0,1 мг/кг, подкожно). Животных наркотизировали введением Zoletil 100 (10 мг/кг, внутримышечно). Проверку наркоза осуществляли по исчезновению реакции на болевой раздражитель (укол лапы) и угнетению роговичного рефлекса. По средней линии шеи проводили разрез кожи и мягких тканей для открытия доступа к сосудам. Поочередно выделяли сосудисто-нервные пучки, препарировали обе общие сонные артерии и поднимали их на лигатуры (без соединительной ткани и сопутствующих пучков нервных волокон), затем проводили перевязку – на каждую артерию накладывали по 2 лигатуры на расстоянии 2–3 мм друг от друга. После рана ушивалась и обрабатывалась антисептиком (Рисунки 6 и 7). Контрольным животным необратимая двусторонняя перевязка общей сонной артерии не выполнялась.

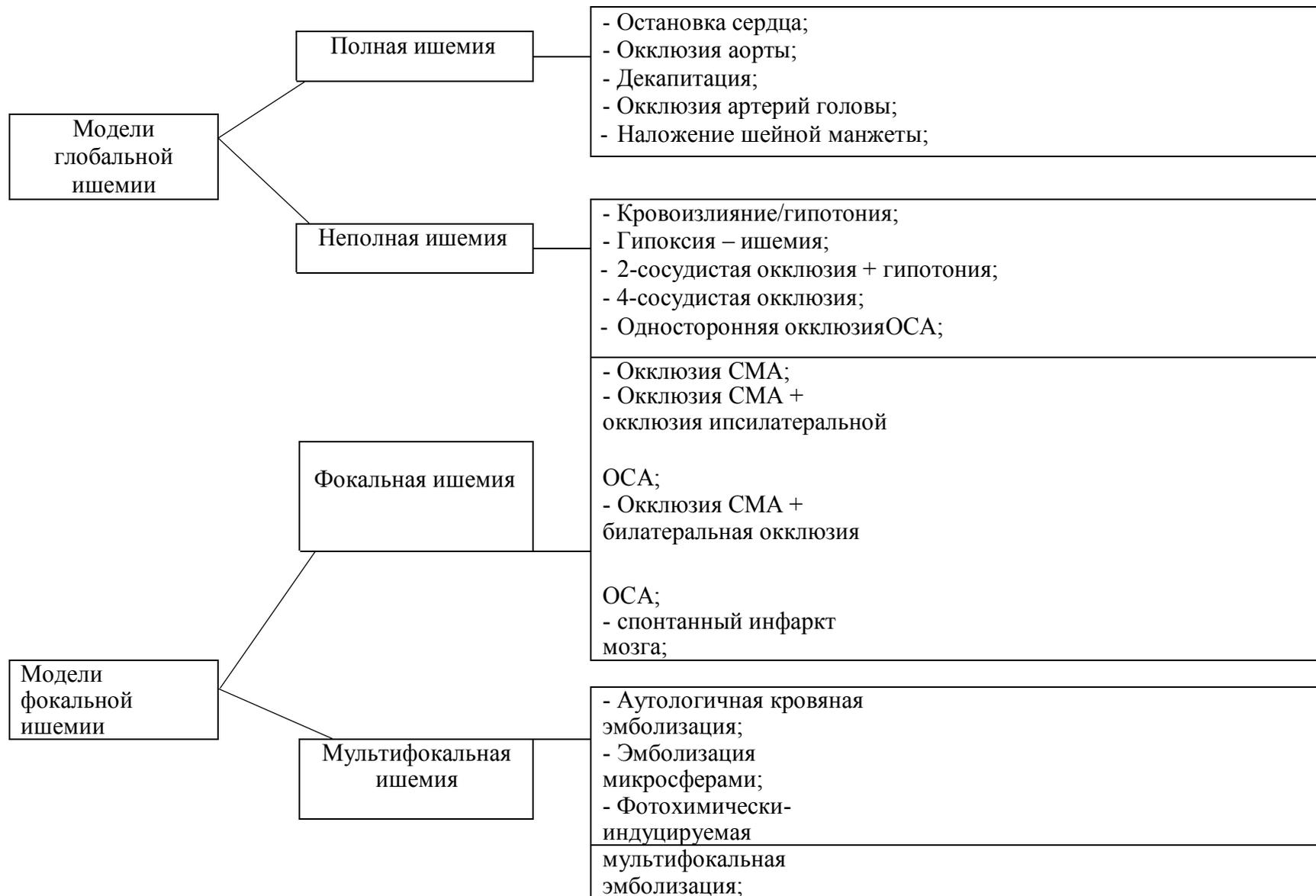


Рисунок 5 – Основные виды экспериментальных моделей ишемического инсульта (Liu F., McCullough L. D., 2011)

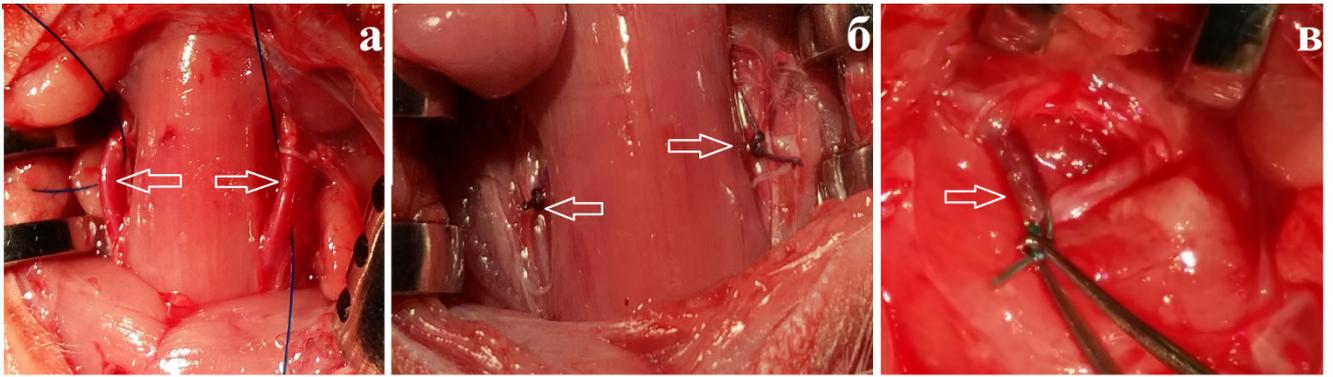


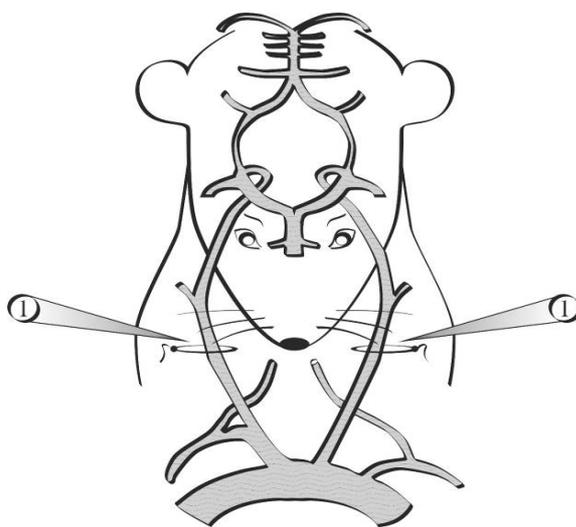
Рисунок 6 – Общая сонная артерия до перевязки (а) и после перевязки (б, в)

Состояние животных в послеоперационном периоде оценивалось в баллах с учётом принципов исследования физиологии и патофизиологии головного мозга [38].

Через 30 мин после проведения операции показатель общего состояния животного составлял $(42,0 \pm 4,5)$ балла. Рефлекс переворачивания при положении на спине был слабый, у части животных отсутствовал. Наблюдалась атаксия. Роговичный рефлекс был слабый с двух сторон. На шумовой и болевой раздражители животные реагировали слабо. Отмечались клонические судороги. Отношение к пище и воде отсутствовало.

Через 1 сут показатель общего состояния животных снизился до $(25,0 \pm 3,5)$ балла. Животные неактивно передвигались по клетке. Рефлекс переворачивания при положении на спине был слабый, отмечалась атаксия. Клонические судороги отсутствовали. Реакция на боль адекватная, на шумовой раздражитель нормальная. Часть крыс имели снижение аппетита.

Через 3–7 сут после проведения операции показатель общего состояния животных составил $(14,0 \pm 3,0)$ балла. Состояние животных улучшалось, однако сохранялась атаксия, часть животных была гипоактивна и имела неопрятный внешний вид, нормальную позу животные удерживали неустойчиво. Через 14–30 сут показатель общего состояния животных снизился до $(10,0 \pm 2,0)$ балла.



Примечания: 1 – Общая сонная артерия (a. carotis communis). В. В. Кришот, Т. А. Румянцева, В. Г. Никонорова. Церебральная гипоперфузия в эксперименте. Иваново. 2020 г.

Рисунок 7 – Двусторонняя перевязка общей сонной артерии у крыс

Сохранялся неврологический дефицит, что свидетельствовало о длительном восстановлении психоневрологического статуса после необратимой двусторонней перевязки общей сонной артерии.

2.3 Методы исследования

Гистологическое исследование. После необратимой двусторонней ПОСА 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 [97, 185].

С целью профилактики появления артефактных темных нейронов были соблюдены 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 [143].

Головной мозг экспериментальных животных заключали в парафин. Выделяли сенсомоторную область коры головного мозга с использованием стереотаксических атласов мозга крысы [198]. Серийные фронтальные срезы изготавливались толщиной 2–4 мкм через весь мозг на уровне 1.2 – (–3.0) от Брегмы (СМК) (Рисунок 8). Ориентиром для приготовления серийных фронтальных срезов служила Брегма – антропометрическая точка на крыше черепа, соответствующая месту соединения сагиттального и венечного швов. Для окраски гематоксилин-эозином и тионином 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 СМК головного мозга крыс. При морфометрическом анализе брали 200 (на срок) случайно выбранных полей зрения.

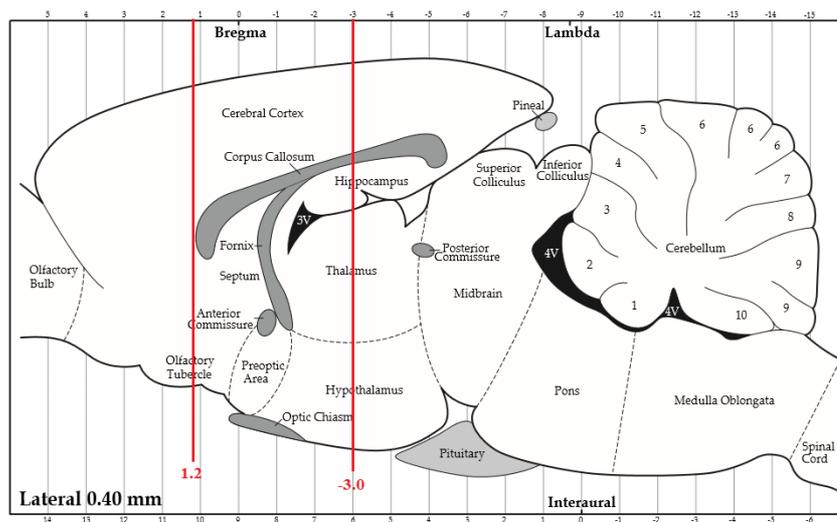


Рисунок 8 – Уровни приготовления серийных фронтальных срезов СМК головного мозга крыс относительно Брегмы

Области головного мозга крысы, охваченные при приготовлении серийных фронтальных срезов представлены на рисунке 9. Это дало возможность получить на срезах нейронные образования СМК мозга крысы в полном объеме.

Для формирования вариационных рядов использовали случайным образом отобранные цветные изображения соответствующего отдела СМК: 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) СМК. Такой подход позволил максимально полно отразить разброс изученных количественных переменных.

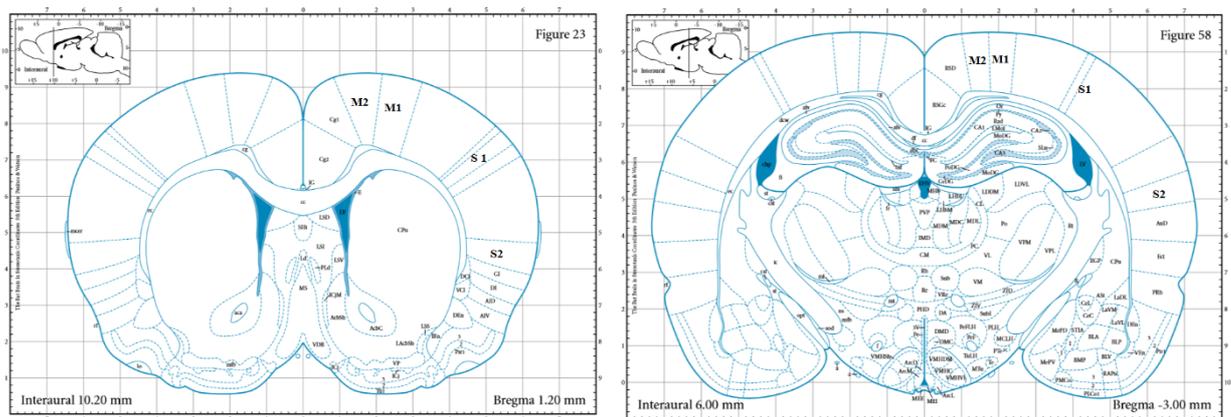


Рисунок 9 – Структуры головного мозга крысы, охваченные при приготовлении серийных фронтальных срезов: M1 (primary motor cortex) – первичная моторная кора, M2 (secondary motor cortex) – вторичная моторная кора, S1 (primary somatosensory cortex) – первичная соматосенсорная кора, S2 (secondary somatosensory cortex) – вторичная соматосенсорная кора

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

В ходе морфологического исследования препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином, выявляли ишемические изменения нейронов в виде резко выраженной эозинофилии их цитоплазмы. На препаратах, окрашенных тионином по методу Ниссля, проводилась оценка состояния нейронов и глиальных клеток [22], также идентификация глиальных клеток (астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов) [67]. Идентификация нейронов проводилась по наличию ядрышек на срезах перикарионов в связи с устойчивостью этой структуры нейрона к ишемическому повреждению. Общую численную плотность пирамидных нейронов, астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов определяли на препаратах, окрашенных тионином по методу Ниссля.

В ходе морфометрического исследования определяли процентное содержание нормо-, гипо- и гиперхромных нейронов (гиперхромных несморщенных и гиперхромных сморщенных). Иммуногистохимические реакции использовали для идентификации астроцитов (GFAP), микроглиоцитов (IBA1), нейронов (NSE) и синаптических терминалей (p38). Для проведения морфометрического анализа использовали программу ImageJ 1.53. Благодаря этой программе вычисляли количество объектов (клетки, ядра), их площади, статистические показатели распределения (гистограммы) пикселей различных областей. Программа осуществляла построение гистограмм распределения пикселей в диапазонах 0–255 оттенков серого, красного, синего и зеленого цвета.

С помощью светового микроскопа Leica DM 1000 делались цифровые микрофотографии (tif, 2 048 × 1 536 пикселей) на увеличении × 4, × 10, × 40 и × 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>).

Иммуногистохимическое исследование. Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах, помещенных на маркированные предметные стекла Snowcoat X-TRA, цветное поле для маркировки – Snowcoat X-TRA M/Slides (США). Использовали первичные антитела к IBA1 (ionized calcium

binding adapter protein 1) – кальций-связывающему белку, специфичному для микроглии (PA5-21274) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 : 100 (ThermoFisher, USA); GFAP (glial fibrillary acidic protein) – глиальному фибриллярному кислому белку астроцитов (MA5-12023, клон ASTRO6) – мышинные моноклональные антитела, разведение 1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ThermoFisher, USA); NSE (neuron-specific enolase) – нейрон специфической енолазе (PA5-27452) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 : 100 (ThermoFisher, USA); p38 (synaptophysin) – синаптофизин (E2174) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 : 300 (Spring Bioscience, USA). После реакции с первичными антителами срезы инкубировали с соответствующими вторичными антителами, хромогеном DAB (3,3'-диаминбензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистерол. Для визуализации использовали набор реагентов на основе полимера NovoLink и пероксидазы NovoLink Polymer Detection System (Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии).

В процессе приготовления препаратов использовали: отмывочный раствор Бонд (Bond Wash Solution 10X Concentrate, 1 L), Буфер для демаскировки pH 9 (Epitope Retrieval Solution pH 9 ($\times 10$ Conc) 1 L), раствор для разведения антител (Bond Primary Antibody Diluent) (Страна происхождения: Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии).

Электронномикроскопическое исследование. Для электронномикроскопического исследования мозг экспериментальных животных фиксировали путем транскардиальной перфузии смеси 4 % раствора параформальдегида, 1 % раствора глутарового альдегида, 5 % раствора сахарозы на 0,1 М фосфатном буфере (pH = 7,4) в течение 15–20 мин под давлением 90 мм рт. ст. После фиксации мозг извлекали и дофиксировали в аналогичной смеси фиксатора при +4 °С. Для исследования выделяли СМК. Затем материал промывали в фосфатном буфере и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие (70–100 нм) срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Использовали ультрамикротом LKB-8800 (Швеция). Просмотр и фотографирование ультратонких срезов

производили на электронном микроскопе Hitachi-600H (Япония). Исследование осмированных препаратов проводилось для общей оценки состояния нейропиля и клеток мозга.

Анализ изображений. Препараты приготовлены в соответствии с инструкциями фирмы производителя реагентов, фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (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).

С помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods) осуществляли фрактальный анализ полученных изображений [155].

Фрактальный анализ использовали для оценки астроцитарных сетей. Рассчитывали фрактальную размерность (ФР – показатель заполнения пространства фрактальной структурой) и лакунарность (Л – меру неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой). Это позволило дать дополнительную количественную характеристику астроцитов, которая включала в себя, помимо оценки площади астроцитов, оценку формы и распределения отростков в пространстве.

В СМК большого мозга определяли относительную площадь *GFAP*-позитивного материала в поле зрения (по 25 полей зрения на каждый срок), фрактальную размерность (ФР – показатель заполнения пространства фрактальной структурой) и лакунарность (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 [155]. Чем выше лакуарность, тем больше в изучаемом распределении имеется областей без *GFAP*.

2.4 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 [218]. В настоящем исследовании мы сравнивали по 25 рандомизированных полей зрения.

Биометрический анализ осуществлялся с использованием программы Statistica 8.0 и возможностей программы Microsoft Excel. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принимался равным 0,05. Проверка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Shapiro – Wilk (Statistica 8.0), статистических гипотез – с помощью непараметрических методов статистики. При получении статистически значимого результата проводили парное сравнение с помощью Mann – Whitney U-test, ANOVA Kraskel – Wallis для независимых выборок и Wilcoxon test для зависимых выборок. Использовались также критерий χ^2 и Фишера. Материал представлен в процентах (95 % доверительный интервал), как медиана ($Q2$) нижний ($Q1$) и верхний ($Q3$) квартили (StatSoft Statistica 8.0; MedCalc 11.6.1.0) [11].

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Гистологическое исследование цитоархитектоники сенсомоторной коры мозга крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий

Новая кора большого мозга крысы имеет 6 слоев, состоящих из тел нейронов и нервных волокон. В слоях III и V СМК мозга крыс преобладают пирамидные нейроны, в слоях II и IV СМК зерновидные и звездчатые нейроны (Рисунок 10).

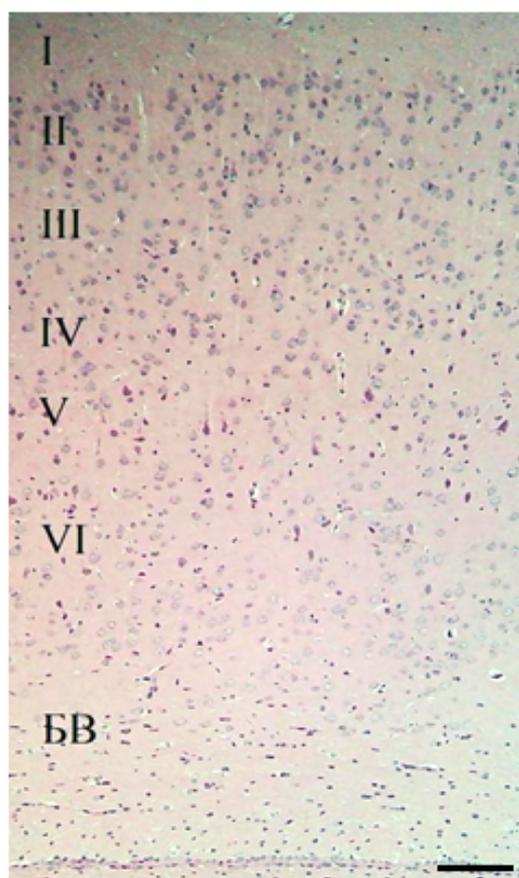


Рисунок 10 – Сенсомоторная кора мозга крысы в контроле: по методу Ниссля. Молекулярный слой, представленный нервными волокнами (I); наружный (II) и внутренний (IV) зернистые слои с преобладанием зерновидных и звездчатых нейронов; наружный (III) и внутренний (V) пирамидные слои, основными клетками которых являются пирамидные нейроны; мультиморфный слой (VI) и белое вещество (БВ). Объектив $\times 10$, шкала – 100 мкм

На фронтальных срезах в контроле на малом увеличении (объектив $\times 10$) преобладают нормохромные нейроны, расположены равномерно во всех слоях СМК. Встречаются нейроны с изменением тинкториальных свойств (гиперхромные с и без сморщивания) в слоях III и V СМК. Очаги «выпадения» нейронов отсутствуют. Отмечается модульная организация коры. Отсутствуют признаки гидропической дистрофии (вакуолизация ядра и цитоплазмы, отек-набухание) и некроза (колликвационного и коагуляционного), нейронов с крайней степенью деструкции (гиперхромные со сморщиванием и клеток-теней) единицы (Рисунки 10 и 11).

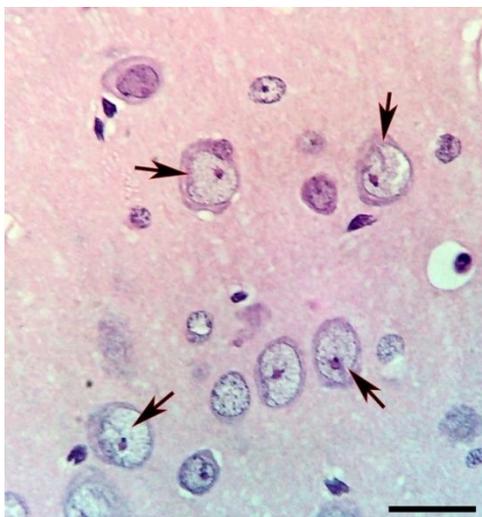


Рисунок 11 – слой III СМК мозга крыс в контроле: преобладают нормохромные пирамидные нейроны (черные стрелки). Окраска гематоксилин-эозином, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм

На большом увеличении светового микроскопа (объектив $\times 40$) все структуры нейрона хорошо верифицируются. В цитоплазме нормохромных пирамидных нейронов ядро имеет центральное расположение и занимает практически всю цитоплазму тела нейрона, содержит ядрышко. Различимы апикальные дендриты.

При неполной глобальной ишемии на малом увеличении (объектив $\times 10$) слои СМК различимы нечетко, видны многочисленные очаги «выпадения»

нейронов (Рисунок 12). На препаратах, окрашенных тионином по методу Ниссля и гематоксилином-эозином обнаружены изменения тинкториальных свойств нейронов (гиперхромные со сморщиванием и без сморщивания, клетки-тени) на протяжении всего исследуемого периода (1, 3, 7, 14 и 30 сут) с преобладанием в слое V СМК (см. Рисунок 12). Через 1–14 сут нейроны с изменением тинкториальных свойств встречались в слоях II–V СМК (Рисунок 12 А, Б, В, Г). Через 30 сут в слоях III–V СМК (см. Рисунок 12 Д).

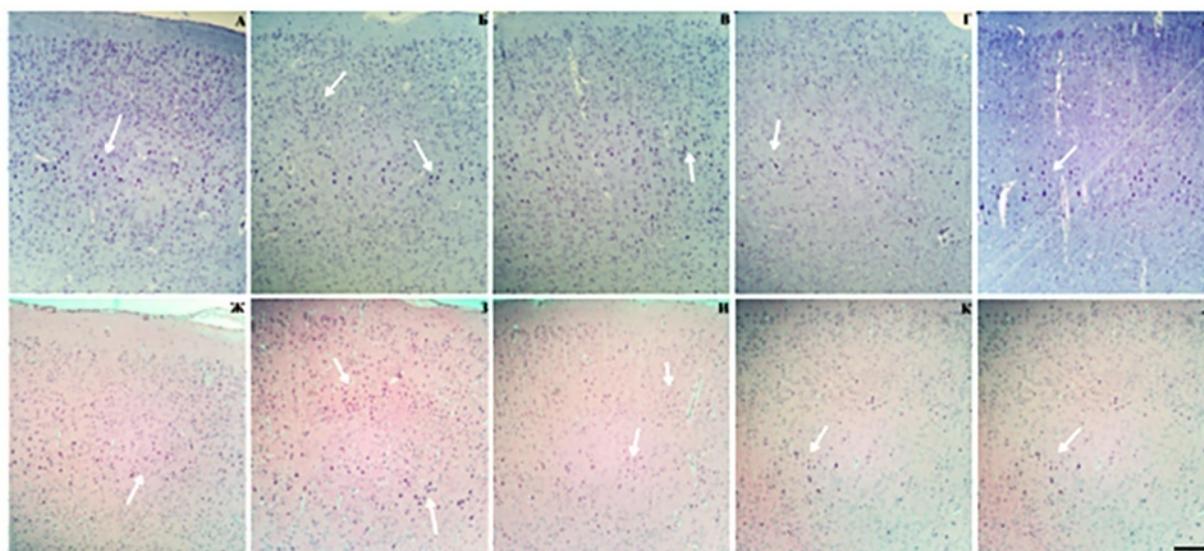


Рисунок 12 – Фронтальные срезы через все слои СМК мозга крысы через 1 сут (А, Ж), 3 сут (Б, З), 7 сут (В, И), 14 сут (Г, К) и 30 сут (Д, Л) после двусторонней необратимой окклюзии общих сонных артерий: интенсивно окрашенные нейроны (белые стрелки) выявляются на протяжении всех 30 сут.

Окраска по методу Ниссля (А, Б, В, Г, Д), гематоксилин-эозином (Ж, З, И, К, Л),
объектив $\times 10$, шкала – 100 мкм

При исследовании препаратов, окрашенных тионином по методу Ниссля, на большом увеличении светового микроскопа (объектив $\times 40$, $\times 100$) в ходе морфологического исследования выявляются нормохромные нейроны. Ядро округлое, занимает большую часть перикариона, содержит от одного до нескольких ядрышек, расположенных, преимущественно, в центре. Изменённые

нейроны выявлялись на протяжении всего исследуемого срока. Встречались нейроны с изменением: 1) ядра: деформация, смещение, набухание, гиперхроматоз, увеличение количества ядрышек в ядре и их перемещение на периферию, вакуолизация, кариорексис и кариолизис; 2) нислевского вещества: тигролиз; 3) формы и размера клеток: сморщивание, увеличение размера; 4) тинкториальных свойств: усиление (гиперхромные нейроны), уменьшения (гипохромные, клетки-тени). Вышеперечисленные изменения свидетельствовали о протекающих некротических, гидропических и детидратационных процессах.

Через 1 сут после двусторонней необратимой окклюзии общих сонных артерий встречались нейроны с острым набуханием: увеличение перикарионов в размере, частичный и тотальный тигролиз (встречались нейроны с сохранением и частичным склеиванием тигролиза в основании тел нейронов), резкое набухание апикального дендрита, в некоторых нейронах нечёткость контуров ядер и эктопия ядрышек, ядрышки увеличены в размере. Имелись нейроны с набуханием и гиперхроматозом ядер (Рисунок 13 А, Б, В, Г).

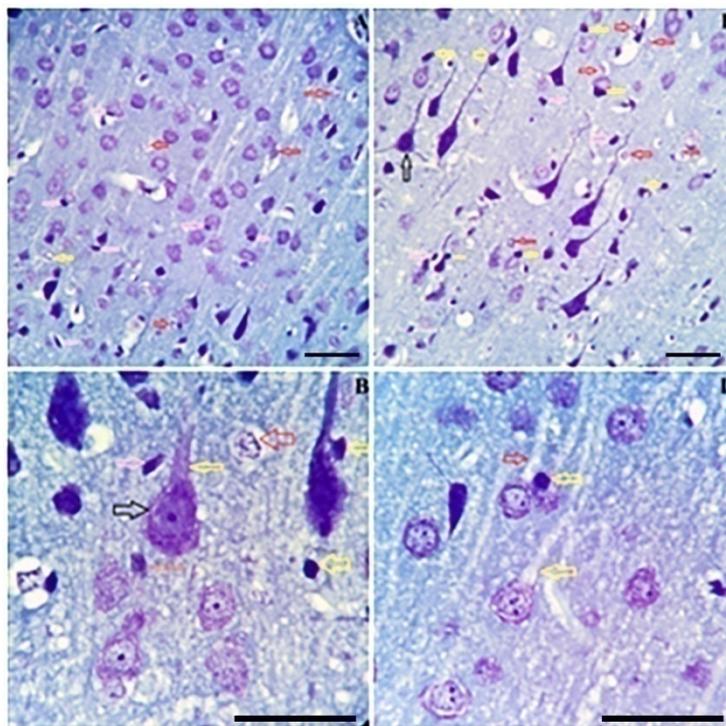


Рисунок 13 – СМК мозга крысы через 1 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий: острое набухание нейронов в слоях III (А, Г) и V (Б, В). Набухшие тела нейронов (черная стрелка) и апикальные дендриты (жёлтая стрелка). Частичный лизис тигроида, встречаются нейроны с частичным склеиванием тигроида в основании нейрона (красная стрелка). Ядра набухшие, встречается гиперхроматоз (Б, В). Гиперхромные нейроны со сморщиванием (зеленая стрелка) и без сморщивания (серая клетка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$ (А, Б), шкала – 50 мкм. $\times 100$ (В, Г), шкала – 20 мкм

Преимущественно в слое V СМК встречались нейроны с изменением формы и размера клеток. Форма перикариона приобретала треугольную и веретеновидную форму, отмечалось изменение тинкториальных свойств в сторону усиления интенсивности окраски цитоплазмы и ядра – сморщивание нейрона. Происходило изменение формы ядра от округлой до веретеновидной, в части нейронов видны ядрышки (Рисунок 14 А). В слое III СМК мозга крыс преимущественно нейроны гиперхромные с сохранением формы – несморщенные нейроны (см. Рисунок 13 А).

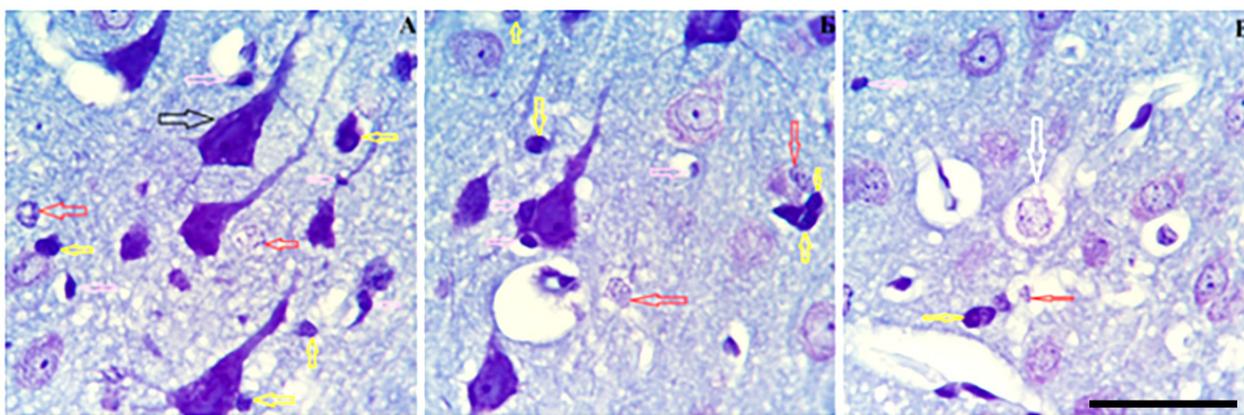


Рисунок 14 – слой V СМК мозга крыс через 1 сут: гиперхромные сморщенные нейроны (черная стрелка) с изменением формы ядра, ядрышко увеличено в размере, эксцентрично; содержание глиальных клеток: астроциты (красная стрелка), олигодендроциты (желтая стрелка), микроглиоциты (розовая стрелка); тяжёлые изменения нейрона (белая стрелка) (В). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 50 мкм

Уже через 1 сут видны мелкие очаги «выпадения» нейронов и клетки-тени (кариоцитоз) (Рисунок 15). Встречались нейроны с тяжёлыми изменениями, которые затрагивали цитоплазму, ядро и ядрышки. Цитоплазма становилась сотовидной, в ядре патологическая зернистость, ядрышки неразличимы. Резко отёчен апикальный дендрит (см. Рисунок 14 В). Отмечено увеличение содержания свободных и сателлитарных глиальных клеток вокруг дегенеративно измененных нейронов. На препаратах, окрашенных тионином по методу Ниссля, нейро-астроцитарные взаимоотношения характеризовались увеличением содержания сателлитарных астроцитов (см. Рисунки 13, 14 и 15). Микроглиоциты имели вытянутую форму, находились рядом с дегенеративно измененными нейронами на разных стадиях дегенерации (см. Рисунки 13, 14 и 15).

Через 3 сут после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий сохранилось острое набухание тел и ядер нейронов, апикальные дендриты резко набухшие (Рисунок 16 А). Встречались нейроны с гидропическими изменениями на разных стадиях водяночной дистрофии. От

частичного перинуклеарного просветления цитоплазмы до появления пузырькообразных нейронов с выраженной вакуолизацией цитоплазмы вследствие перичеселлюлярного отёка (см. Рисунок 16 А).

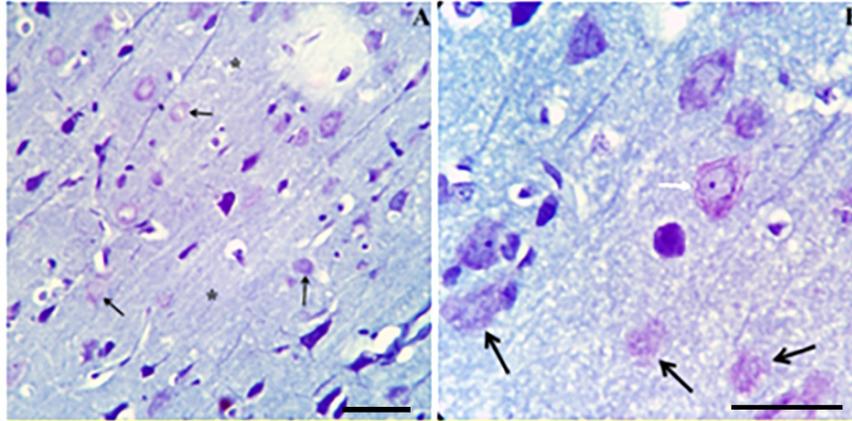


Рисунок 15 – СМК кора полушарий, слой V через 1 сут: очаг «выпадения» нейронов (*) (А); клетки-тени (черная стрелка) (Б); набухание тела, ядра и апикального дендрита нейрона (белая стрелка), гомогенизация цитоплазмы в результате тигролиза, частичное склеивание тигроида в основании нейрона (Б).

Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$ (А), шкала – 50 мкм,
 $\times 100$ (Б), шкала – 20 мкм

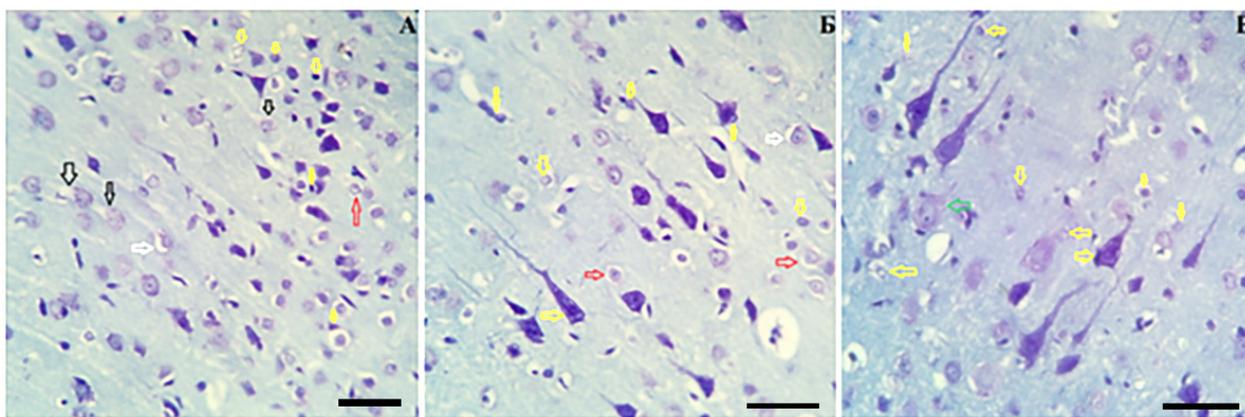


Рисунок 16 – Пирамидные нейроны в слоях III (А, Б) и V (В) СМК крыс через 3 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий: резко отёчные тела и апикальные отростки нейронов (чёрные стрелки); частичное перинуклеарное просветление цитоплазмы (белые стрелки); перичеселлюлярный отек (красные стрелки); гиперхромные сморщенные нейроны (жёлтая стрелка); нейроны с тотальным тигролизом (зеленая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм

Имелись гиперхромные сморщенные нейроны. Тела и ядра приобретали веретенообразную форму, хорошо видны отростки нейронов (см. Рисунок 16 А, Б). Обнаруживались нейроны с тотальным тигролизом, просветлением цитоплазмы и деформацией ядра. Цитоплазма таких нейронов гомогенна, в них отсутствует тигроид (см. Рисунок 16 В). Отмечались участки «выпадения» нейронов. Нейропилль отёчен (Рисунок 17). Вокруг дегенеративно измененных нейронов сохранялось большое содержание глиальных клеток, как свободных, так и клеточных спутников нейронов (сателлитарные глиальные клетки) (см. Рисунок 16). Форма микроглиоцитов варьировала от треугольной до округлой и овальной.

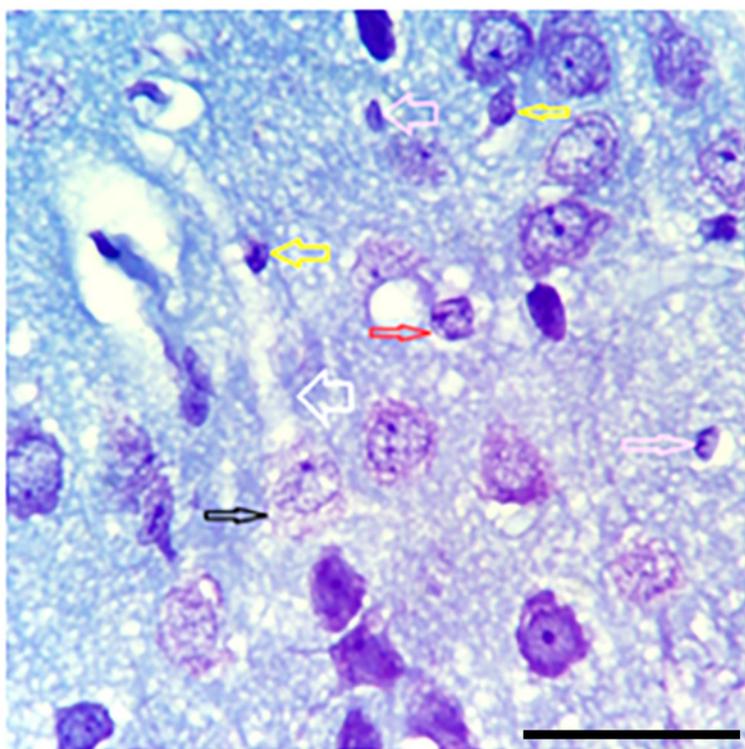


Рисунок 17 – Слой V СМК мозга крыс через 3 сут: отёк нейропиля, его вакуолизация; набухание тела нейрона, цитоплазма сотовидная (черная стрелка); резко отёчен апикальный дендрит (белая стрелка), эктопия ядрышка; астроцит (красная стрелка), олигодендроцит (желтая стрелка), микроглиоцит (розовая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 50 мкм

Через 7 сут сохраняются гидропические изменения, обнаруживался перичеллюлярный и периваскулярный отёк (Рисунок 18 В). Часть нейронов приобретала сотовидную цитоплазму (см. Рисунок 18 В), сохранялась резкая отёчность апикальных дендритов (Рисунок 18 Б). В результате длительно сохраняющейся гипоксии происходила гомогенизация цитоплазмы, она становилась бледной вследствие лишения тигроида (Рисунок 18 А). Гиперхромные сморщенные нейроны встречались в слоях III и V СМК большого мозга белых крыс. В слое III СМК встречались очаги «выпадения» нейронов. Нейроглиальные взаимоотношения через 7 сут после ПОСА характеризовались увеличением сателлитарных олигодендроцитов около патологически измененных

нейронов (см. Рисунок 17). Присутствовали свободные астроциты и микроглиоциты.

На большом увеличении светового микроскопа (объектив $\times 100$) выявлялись нейроны с тяжёлыми изменениями в цитоплазме (резкая крупноячеистая вакуолизация тел нейронов), в ядре (вакуолизация ядра, включения патологические, несколько ядрышек, которые располагаются эксцентрично) (Рисунок 19).

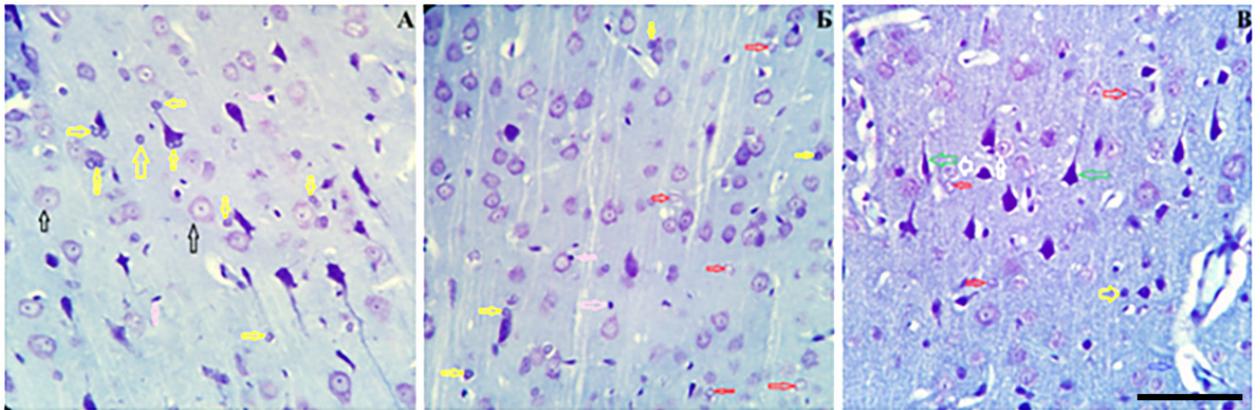


Рисунок 18 – Пирамидные нейроны в слоях III (А, Б) и V (В) СМК мозга крыс через 7 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий: цитоплазма части нейронов гомогенна, лишена тигроида (черная стрелка); сотовидная цитоплазма нейрона (белая стрелка); гиперхромные сморщенные нейроны с перичеселлюлярным (зеленая стрелка), периваскулярный отёк (синяя стрелка); большое содержание олигодендроцитов (желтая стрелка), астроциты (красная стрелка), микроглиоциты (розовая стрелка).
Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм

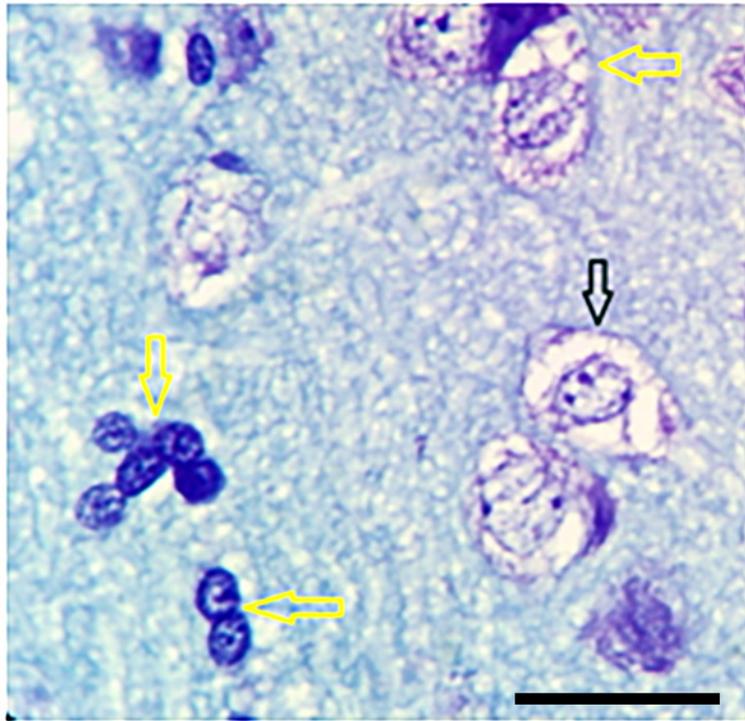


Рисунок 19 – Пирамидные нейроны III слоя СМК мозга крысы: крупноячеистая вакуолизация тел нейронов (черная стрелка); вакуолизация ядер; олигодендроциты (желтая стрелка). Отёчность нейропилия. Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм

Через 14 сут на фоне отёчного нейропилия отмечались нейроны с резким отёком апикальных дендритов (Рисунок 20 А, Б, В, Г), появлялись нейроны с побледнением цитоплазмы и ядра (гомогенизация) (см. Рисунок 20 А, Б, В, Г). Обнаруживались очаги «выпадения» нейронов (см. Рисунок 20 Б) и клетки-тени (см. Рисунок 20 А, Б, В, Г). Астроциты располагались вокруг очага дегенеративно поврежденных нейронов, отграничивая неповрежденные нейроны (см. Рисунок 20 В). Наблюдались свободные и сателлитарные олигодендроциты. Встречались микроглиоциты треугольной формы (см. Рисунок 20).

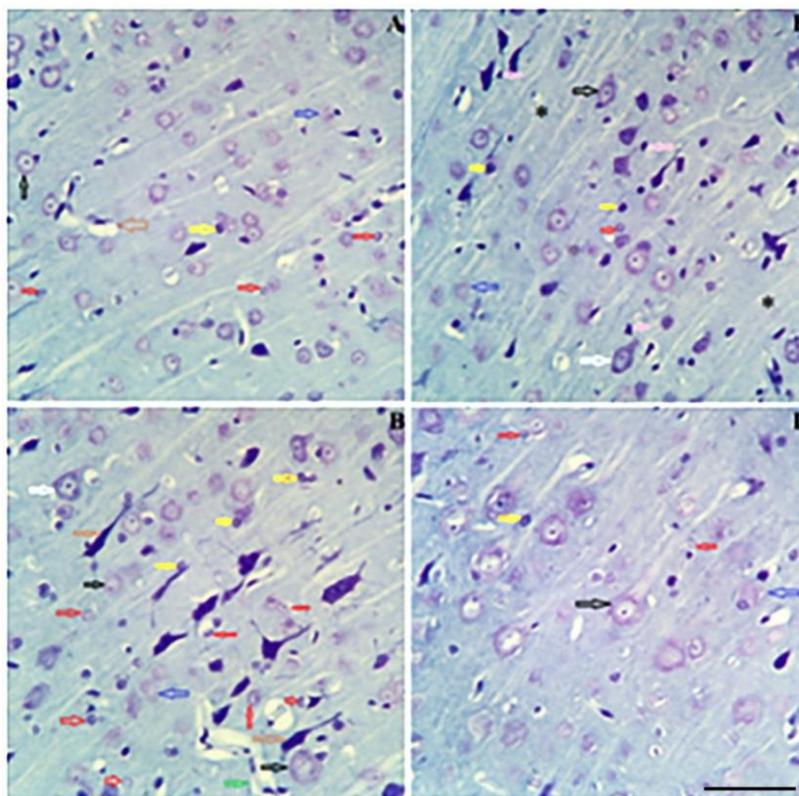


Рисунок 20 – Пирамидные нейроны в слоях III (А, Б) и V (В, Г) СМК мозга крыс через 14 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий: очаги «выпадения» нейронов (*) на фоне отёчного нейропилия; гомогенизация цитоплазмы пирамидных нейронов (черные стрелки); острое набухание пирамидной клетки с частичным тигролизом, ядро светлое с премембранозным гиперхроматозом, отек апикального дендрита (белая стрелка); периваскулярный отек (зеленая стрелка); гиперхромные нейроны со сморщиванием (коричневая стрелка); клетки-тени (синяя стрелка); астроциты (красная стрелка), олигодендроциты (желтая стрелка, микроглиоциты (розовая стрелка).

Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм

На большом увеличении микроскопа (объектив $\times 100$) в слое V СМК встречались гиперхромные сморщенные нейроны с неразличимыми контурами ядра (пикноморфные), у части нейронов перинуклеарное просветление цитоплазмы и перичеселлюлярный отёк (Рисунок 21 А). Отмечались нейроны с тигролизом, их цитоплазма становилась бледной, контуры ядра нечёткие,

ядрышко увеличено в размере, эксцентрично. Апикальный дендрит резко набухший (Рисунок 21 Б). Встречались нейроны на начальной стадии кариоцитоллиза, цитоплазма и ядро таких нейронов гомогенны, апикальный дендрит резко набухший (см. Рисунок 21 Б).

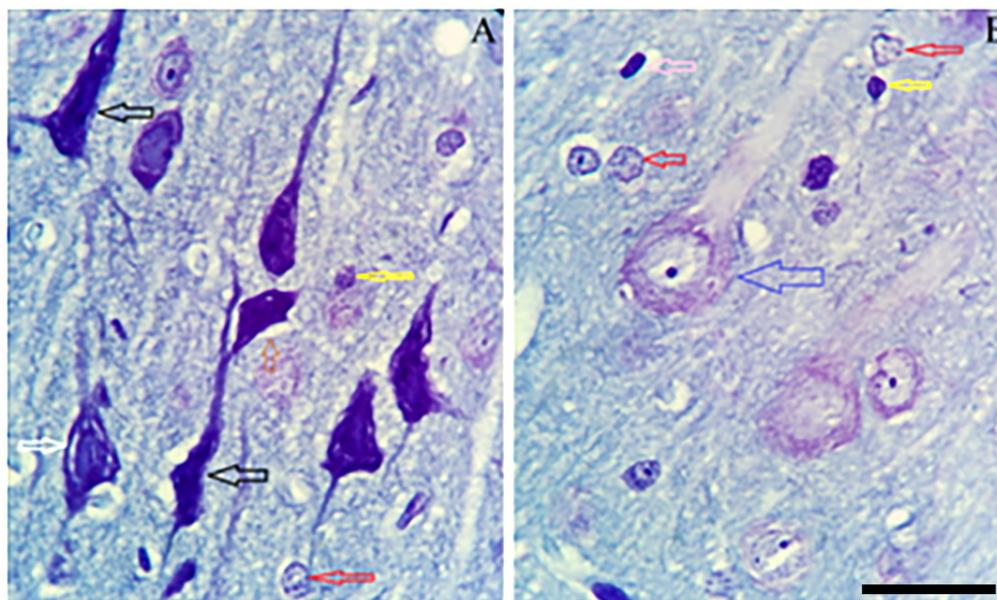


Рисунок 21 – Пирамидные нейроны слоя V СМК мозга крыс через 14 сут: гиперхромные сморщенные нейроны с неразличимыми контурами ядра (пикноморфные) (черные стрелки), с перинуклеарным отёком (белые стрелки); пееллюлярный отёк (коричевая стрелка); пирамидные нейроны с тигролизом и побледнением цитоплазмы, резкое набухание апикального дендрита (синяя стрелка); астроцит (красная стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм

Через 30 сут в слое V СМК мозга крыс выявлялись нейроны с тяжелым изменениями, отмечалась базофилия периферических отделов, нечёткий контур ядра, ядрышко гипертрофировано и расположено эксцентрично (Рисунок 22 Б). Отмечались нейроны с увеличением перикариона, перинуклеарным просветлением цитоплазмы и ее гомогенизацией, ядро уменьшено в размере, контуры нечёткие, ядрышко увеличено в размере (см. Рисунок 22 Б). Часть

нейронов подвергалась гомогенизации цитоплазмы и ядра, контуры ядра не различимы, рисунок в ядре стерт, ядрышки отсутствуют (Рисунок 22 А, Б и Рисунок 23).

Резкое набухание апикальных дендритов пирамидных нейронов и очаги «выпадения» встречались в слоях III и V СМК мозга крыс. Сохранялся перичеселлюлярный и периваскулярный отёк. Нейроны с резким набуханием тел и апикальных дендритов встречались в слоях III и V СМК мозга крыс. Встречались гиперхромные нейроны со сморщиванием (см. Рисунок 21 А, Б, В, Г). Нейроглиальные взаимоотношения характеризовались уменьшением сателлитарных глиальных клеток (см. Рисунки 22 и 23).

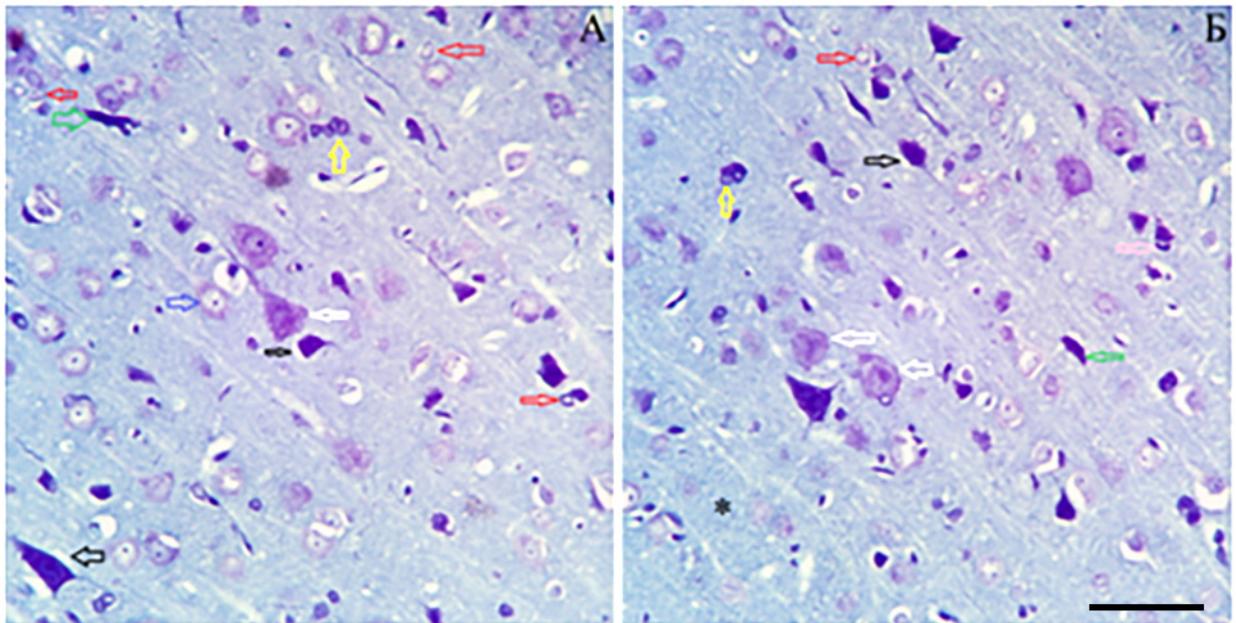


Рисунок 22 – Слой V СМК мозга крыс через 30 сут после необратимой перевязки общих сонных артерий: очаги «выпадения» нейронов (*); гомогенизация цитоплазмы и ядра, контуры ядра не различимы, рисунок в ядре стерт, ядрышки отсутствуют (белые стрелки); перичеселлюлярный отёк (черная стрелка); резкое набухание тел и апикальных дендритов нейронов (синие стрелки); гиперхромные нейроны со сморщиванием (зеленые стрелки). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм

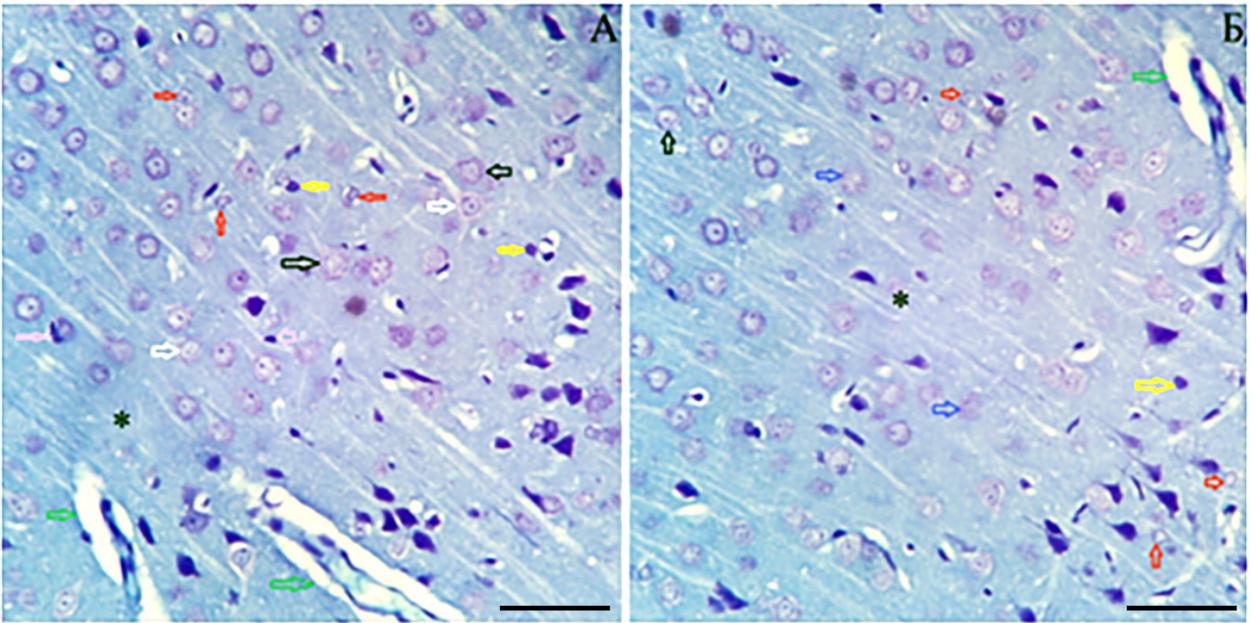


Рисунок 23 – Фрагменты слоя III СМК мозга крыс через 30 сут после необратимой перевязки общих сонных артерий: очаги «выпадения» нейронов (*); резкое набухание тел и апикальных дендритов пирамидных нейронов (чёрные стрелки); гомогенизация и побледнение цитоплазмы (белые стрелки); клетки-тени (кариоцитоллиз) (синие стрелки); периваскулярный отёк (зеленые стрелки); астроциты (красная стрелка), олигодендроциты (желтая стрелка), микроглиоциты (розовая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм

На большом увеличении светового микроскопа (объектив $\times 100$) гомогенизация цитоплазмы и ядра, контуры ядра нечёткие, ядрышко отсутствует, апикальный дендрит набухший, набухание тела и ядра (Рисунок 24). Встречались нейроны с частичным тигролизом, увеличением ядрышка (см. Рисунок 24). Нейроны с кариорексисом и кариолизисом, набуханием тела и апикального дендрита (Рисунок 25).

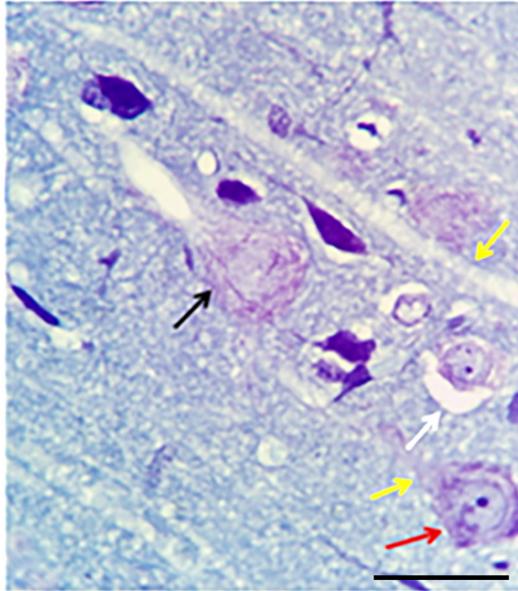


Рисунок 24 – Пирамидные нейроны слоя V СМК мозга крыс через 30 сут: гомогенизация ядра и цитоплазмы пирамидного нейрона, контуры ядра нечёткие, цитоплазма бледная (чёрная стрелка); набухание тела нейрона, частичный тигролиз со склеиванием тигроида в основании нейрона (красная стрелка); перичеселлюлярный отёк (белая стрелка); отёк апикального дендрита (жёлтая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм

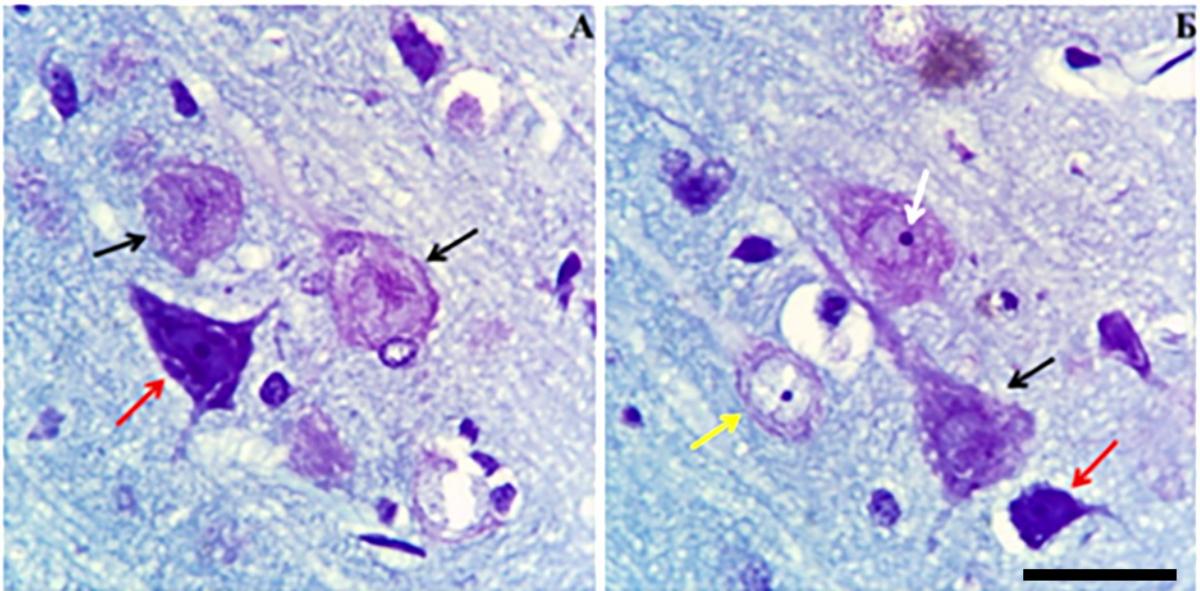


Рисунок 25 – Пирамидные нейроны слоя V СМК мозга крыс через 30 сут: кариолизис, цитоплазма гомогенизирована, вакуолизирована (черная стрелка); гиперхромный сморщенный нейрон, деформация ядра, ядрышко увеличено (красная стрелка); нечёткий контур янда, увеличение ядрышка, эксцентричное расположение (белая стрелка); набухание тела, ядра и апикального дендрита (жёлтая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм

Таким образом, после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий на фоне гидропической дистрофии были выявлены гипохромные и темные нейроны, цитоморфологическая характеристика которых свидетельствовала о наличии динамики их прижизненных дегенеративных изменений. Необратимым дегенеративным изменениям подвергались нейроны уже через 1 сут после перевязки общих сонных артерий. Совместно с изменением нейронов происходило увеличение сателлитарных астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов, что может свидетельствовать о компенсаторной реорганизации нейроглиальных взаимоотношений.

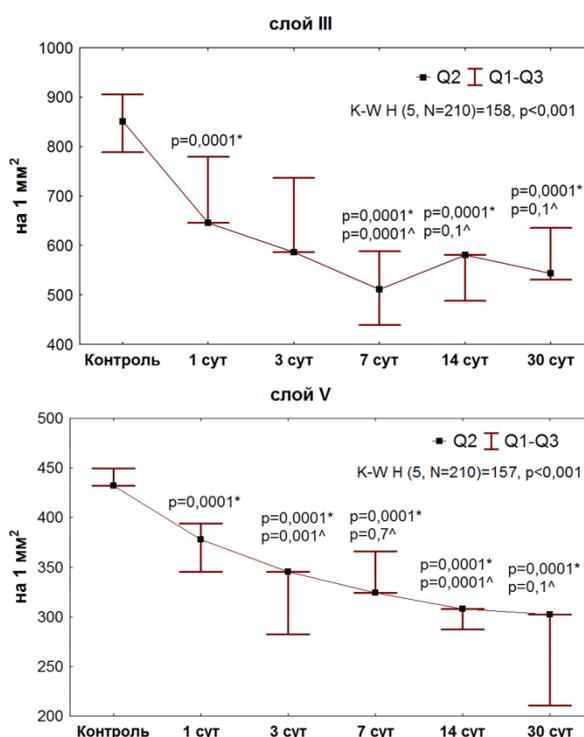
3.2 Морфометрическая характеристика нейроглиальных взаимоотношений сенсомоторной коры мозга крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий

Результатом анализа препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином и тионином по методу Ниссля стало выявление изменений тинкториальных свойств ядра и цитоплазмы нейронов в сторону усиления интенсивности окрашивания (гиперхромные нейроны) с равномерным распределением хроматофильной субстанции, без проявлений хроматолиза и сморщивания перикариона нейрона (несморщенные нейроны). Встречались нейроны с некробиотическими изменениями – гиперхромные нейроны с уменьшением перикариона, деформацией тела и ядра, апикальные и латеральные отростки интенсивно окрашены (сморщенные, пикноморфные).

Отмечались гиперхромные нейроны с шаровидной формой перикариона, тотальным хроматолизом, деформацией ядра или кариолизом, цитоплазма таких нейронов становилась гомогенизированной, как результат гомогенизирующего некроза вследствие глубокого гипоксического состояния головного мозга после необратимой перевязки общих сонных артерий. Чаще этим изменениям подвергались нейроны через 14 и 30 сут с момента перевязки. Встречались нейроны с ослаблением интенсивности окрашивания цитоплазмы и ядра (гипохромные нейроны), цитоплазма таких нейронов окрашивалась бледно, отмечался частичный и тотальный тигролиз. ядро окрашивалось бледно, у части нейронов эксцентричное расположение ядра, ядрышки могли отсутствовать. Часть нейронов имела признаки острого набухания перикариона, его деформацию, кариолиз (клетки-тени).

Через 1 и 3 сут после ПОСА на фоне статистически значимого снижения общей численной плотности нейронов (Mann – Whitney U-Test; $p = 0,0001$) (Рисунок 26) и численной плотности нормохромных нейронов (Mann – Whitney U-Test; $p = 0,0001$) слоев III и V СМК (Рисунок 27) отмечено увеличение нейронов с патологическими изменениями. Установлено статистически значимое

увеличение количества гиперхромных несморщенных нейронов в обоих исследуемых слоях в сравнении с контролем. Уже с 1-х сут встречались нейроны с необратимыми дегенеративными изменениями, отмечено увеличение численной плотности гиперхромных сморщенных нейронов (Рисунок 28), появились клетки-тени (Рисунок 31). Численная плотность астроцитов в остром периоде ишемии (через 1 и 3 сут) снижалась на 24,6 % через 1 сут и через 3 сут дефицит достигал максимума – 33,3 %. Через 3 сут в слое III СМК дефицит олигодендроцитов достиг самого высокого уровня и составил 33,8 %. Отмечалась пролиферативная активность микроглиоцитов, нейроглиальные взаимоотношения характеризовались статистически значимым увеличением численной плотности микроглиоцитов через 1 и 3 сут после ПОСА, в слое III СМК их численная плотность увеличилась на 16,7 % и 5 % соответственно, в слое V СМК – 14,3 % и 11,4 % (Рисунок 30).



Примечание: * сравнение с интактными животными, ^ – сравнение с предыдущим сроком (критерий Манна – Уитни), различия статистически значимы при $p < 0,05$. Материал предоставили как медиану (Me) (Q2), 25–75 % квантили (Q1–Q3).

Рисунок 26 – Общая численная плотность нейронов (на мм²) в слоях III (А) и V (Б) СМК мозга крыс в контрольной группе и после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий на протяжении всего исследуемого срока (1, 3, 7, 14 и 30 сут)

Через 7 сут с начала ПОСА в слое III СМК мозга крыс отмечали пик снижения общей численной плотности нейронов, дефицит составил 37,1 % от контрольных значений. К концу исследуемого срока в слое III статистически значимо уменьшилась общая численная плотность на 33,5 %. В слое V СМК мозга крыс через 7 сут общая численная плотность продолжала снижаться и дефицит составил 23 % (см. Рисунок 26).

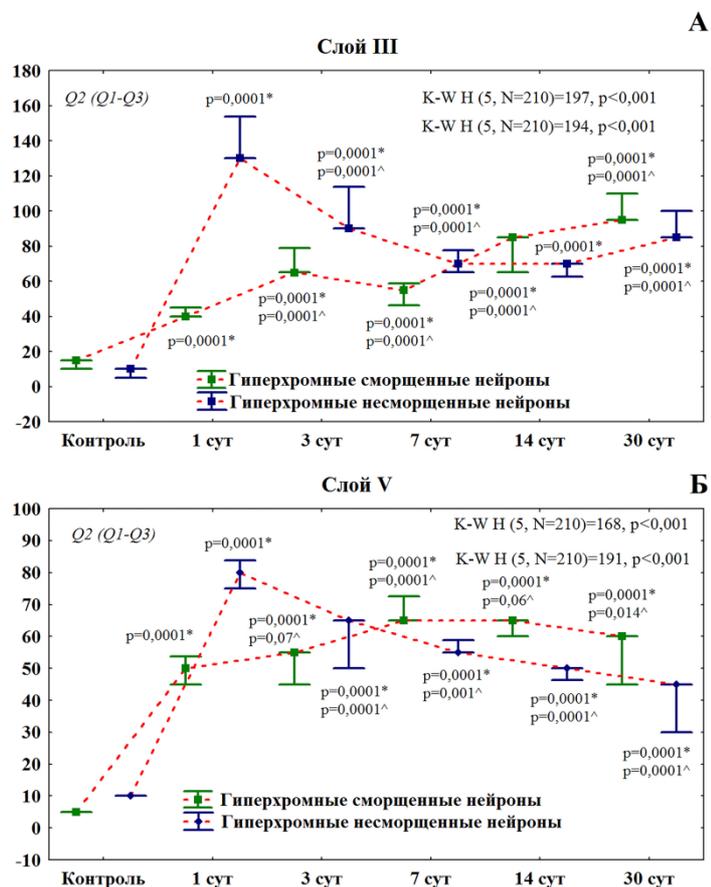


Примечание: * сравнение с интактными животными, ^ – сравнение с предыдущим сроком (критерий Манна-Уитни), различия статистически значимы при $p < 0,05$. Материал предоставили как медиану (Me) (Q2), 25–75 % квантили (Q1–Q3).

Рисунок 27 – Численная плотность нормохромных нейронов (на мм^2) в слоях III (А) и V (Б) в контрольной группе и после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий на протяжении всего исследуемого срока (1, 3, 7, 14 и 30 сут)

Численная плотность нормохромных нейронов через 7 сут после ПОСА продолжала снижаться. В слое III СМК дефицит составил 37 % от контрольных значений, в слое V СМК 23 % (см. Рисунок 27). Количество нейронов с обратимыми дегенеративными изменениями (гиперхромных несморщенных нейронов) уменьшалось в обоих исследуемых слоях (см. Рисунок 28). В слое III СМК в сравнении с предыдущим сроком через 7 сут после ПОСА статистически значимо уменьшилось количество гиперхромных сморщенных нейронов (Mann – Whitney U-test; $p = 0,0001$), в сравнении с контролем в 3,6 раза (Mann – Whitney U-test; $p = 0,0001$). В слое V отмечено статистически значимое увеличение численной плотности гиперхромных сморщенных нейронов в сравнении со значениями контроля и предыдущего срока (Mann – Whitney U-test;

$p = 0,0001$) (см. Рисунок 28). Численная плотность гипохромных нейронов в слое III и V СМК головного мозга крыс увеличилась через 1 сут после необратимой двусторонней ПОСА и сохранялась выше контрольных значений на протяжении всего исследуемого срока (Рисунок 29).

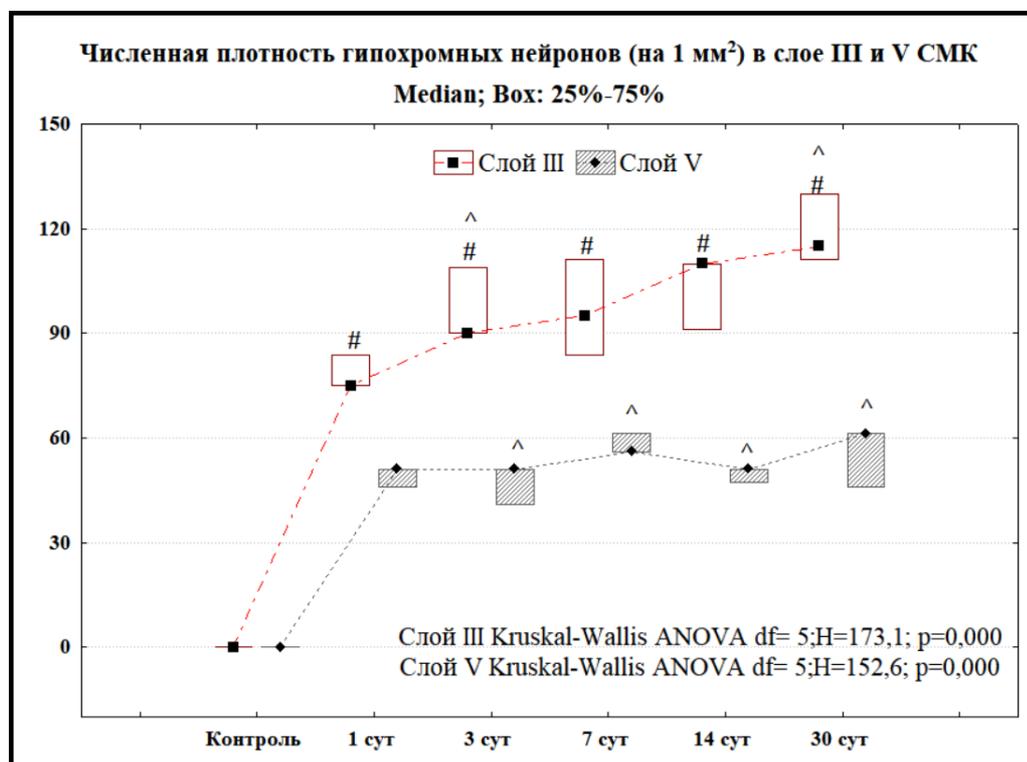


Примечание: * – сравнение с контролем, ^ – сравнение с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test). Различия статистически значимы при $p < 0,05$. Материал предоставлен как медиана (Q2) и 25–75 % квартили (Q1–Q3). Различия между всеми сроками после ПОСА статистически значимы по результатам ANOVA Kraskel – Wallis (K–W).

Рисунок 28 – Численная плотность гиперхромных несморщенных и сморщенных нейронов в слое III и V СМК мозга крыс в контроле, через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ПОСА

Численная плотность микроглиоцитов статистически значимо снижалась, дефицит в слое III СМК составил 30 %, в слое V СМК – 11,4 % мозга крыс (см. Рисунок 30). Через 14 сут после ПОСА продолжалось уменьшение общей

численной плотности нейронов и численной плотности нормохромных нейронов (см. Рисунки 26 и 27). На этом фоне статистически значимо уменьшалось количество нейронов с обратимыми дегенеративными изменениями. Численная плотность нейронов с необратимой деструкцией увеличивалась (см. Рисунки 28 и 31).

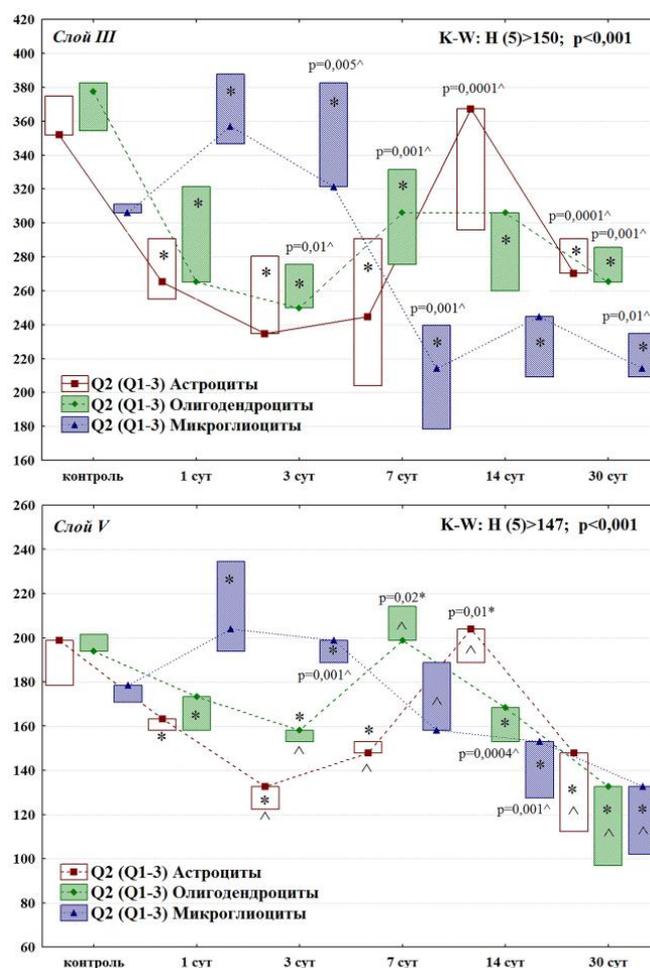


Примечание: * – парное сравнение с контролем, ^ – сравнение с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test). Отдельные звездочка и галочка – при $p = 0,0001$. Материал предоставлен как медиана (Q2) и 25–75 % квартили (Q1–3). Различия между всеми сроками после ПОСА статистически значимы по результатам ANOVA Kraskel – Wallis (K–W). Различия статистически значимы при $p < 0,05$.

Рисунок 29 – Численная плотность гипохромных нейронов (на 1 мм²) в слое III и V СМК мозга крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий, *Me (QL–QU)*

Одновременно с этими изменениями отмечена пролиферативная активность астроцитов, их численная плотность увеличилась на 4,3 % в слое III СМК, в слое

V CMK – 2,6 %. Отмечен минимальный дефицит олигодендроцитов – 18,9 % и 13,1 % в слоях III и V CMK мозга крыс соответственно (см. Рисунок 30).

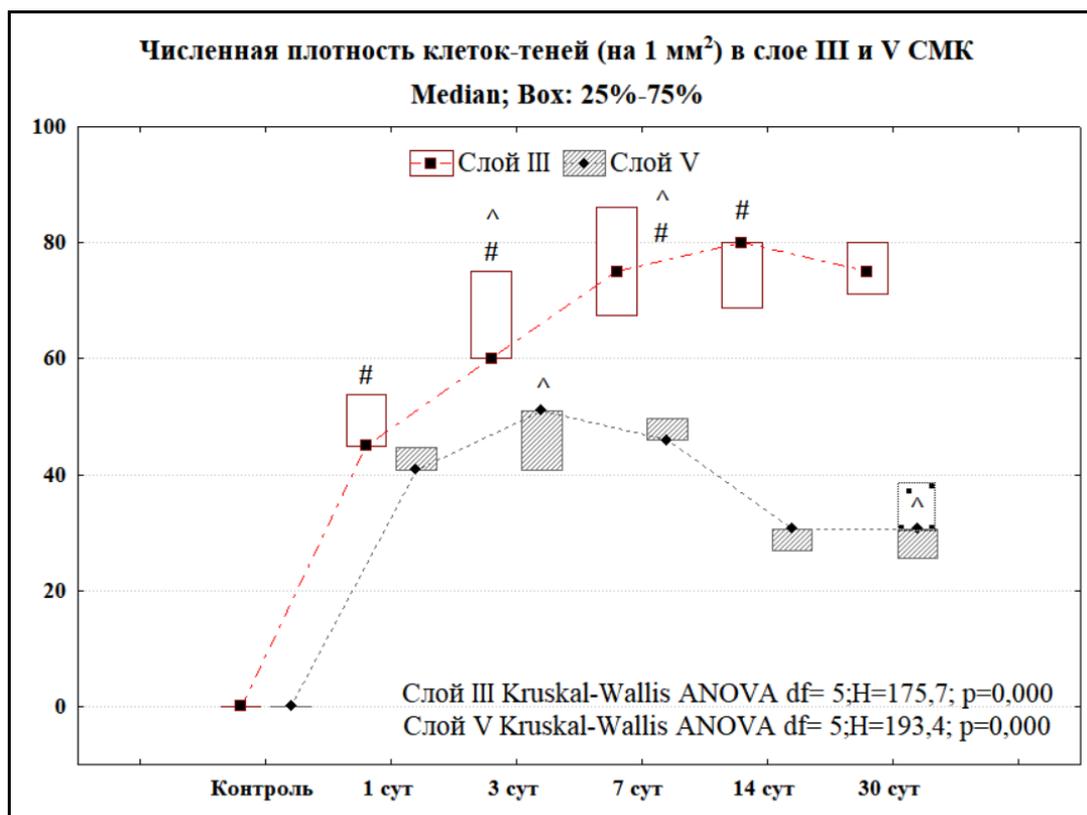


Примечание: * – парное сравнение с контролем, ^ – сравнение с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test). Отдельные звездочка и галочка – при $p = 0,0001$. Материал предоставлен как медиана (Q2) и 25–75 % квартили (Q1–3). Различия между всеми сроками после ПОСА статистически значимы по результатам ANOVA Kraskel – Wallis (K–W). Различия статистически значимы при $p < 0,05$.

Рисунок 30 – Численная плотность астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов в слое III и V CMK мозга крыс в контроле и после необратимой двусторонней ПОСА через 1, 3, 7, 14 и 30 сут

Через 30 сут после ПОСА наблюдался пик уменьшения нормохромных нейронов, снижение в слое III CMK составило 75,9 %, в слое V CMK мозга крыс –

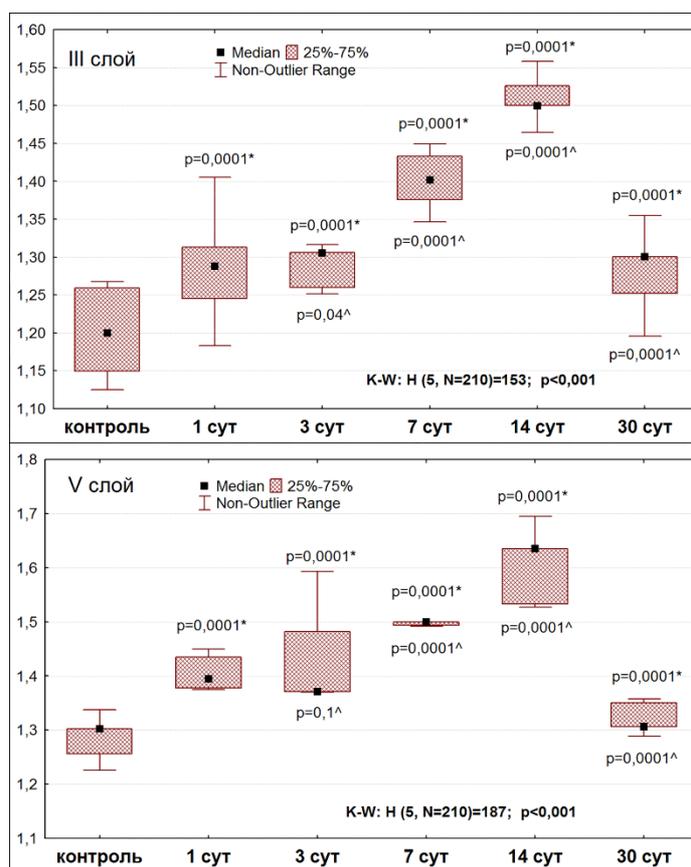
72,6 %. Происходило накопление нейронов с необратимыми дегенеративными изменениями на фоне статистически значимого снижения общей численной плотности нейронов. Нейроглиальные взаимоотношения характеризовались статистически значимым снижением всех глиальных клеток. Что свидетельствует о смещении баланса в сторону образования и накопления необратимо измененных нейронов с прогрессивным истощением резервов саногенетических механизмов.



Примечание: * – различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$), # – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test; $p < 0,05$). При множественном сравнении по срокам (ANOVA Kraskel – Wallis).

Рисунок 31 – Численная плотность клеток-теней (на 1 мм²) в слое III и V СМК мозга крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий,
Me (QL–QU)

После ПОСА происходило изменение соотношения нейронов и глиальных клеток на всем протяжении исследуемого периода (1–30 сут). Реорганизация межнейронных отношений СМК происходила с участием всех глиальных клеток – астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов. В слоях III и V СМК мозга крыс уже через 1 сут после ПОСА происходило статистически значимое увеличение нейроглиального индекса. Рост нейроглиального индекса в слоях III и V СМК отмечен через 10–14 сут с достижением максимальных значений через 14 сут после ПОСА. Через 30 сут отмечено статистически значимое снижение нейроглиального индекса. Эти изменения свидетельствуют о том, что уже через 1 сут после ПОСА один нейрон получал большую «помощь» от глиальных клеток, чем в контроле. В течение наблюдения происходило изменение функциональной активности нейронов и наблюдалась реактивность глиальных клеток (Рисунок 32).



Примечание: * – сравнение с контролем, ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test), различия статистически значимы при $p < 0,05$. Материал предоставили как медиану (Me) (Q2), 25–75 % квантили (Q1–Q3) и диапазон без выбросов (Min–Max). K–W – ANOVA Kraskel – Wallis.

Рисунок 32 – НГИ в слоях III (а) и V (б) СМК мозга крыс в контроле и после необратимой двусторонней ПОСА

Уменьшение численной плотности нормохромных нейронов на всем протяжении исследуемого срока свидетельствует о тяжести гипоксического состояния головного мозга крыс. В результате необратимой перевязки общих сонных артерий произошло снижение кровотока, которое сохранялось в течение 30 сут. Следствием нарушенного кровотока явились необратимые процессы, протекающие в пирамидных нейронах, которые проявлялись изменением формы и размера перикариона и ядра, появлением гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней.

3.3 Иммуногистохимическое исследование пирамидных нейронов и структур межнейронной коммуникации сенсомоторной коры

Нейрон специфическая енолаза (NSE) является высокоспецифичным нейромаркером и позволяет идентифицировать и выявить функционирующие нейроны. Этот фермент необходим для анаэробного превращения глюкозы в метаболиты, пригодные для окисления.

Для изучения синаптоархитектоники использовался белок синаптофизин (p38) – белок мембран синаптических пузырьков нейронов, принимает участие в регуляции и осуществлении синаптической передачи.

По данным морфологического исследования иммуногистохимических препаратов обнаружены изменения в плотности распределения нейромаркера NSE. Интенсивность экспрессии этого фермента говорит о разной метаболической активности. После ПОСА интенсивность окрашивания NSE-позитивного материала варьировала в разные исследуемые сроки (1–30 сут) и в пределах одного срока (Рисунок 33). Данные изменения могут свидетельствовать о разной метаболической активности в результате ишемического очагового повреждения нейронов. Накопление белка отмечалось в обратимо и необратимо дегенеративно измененных нейронах.

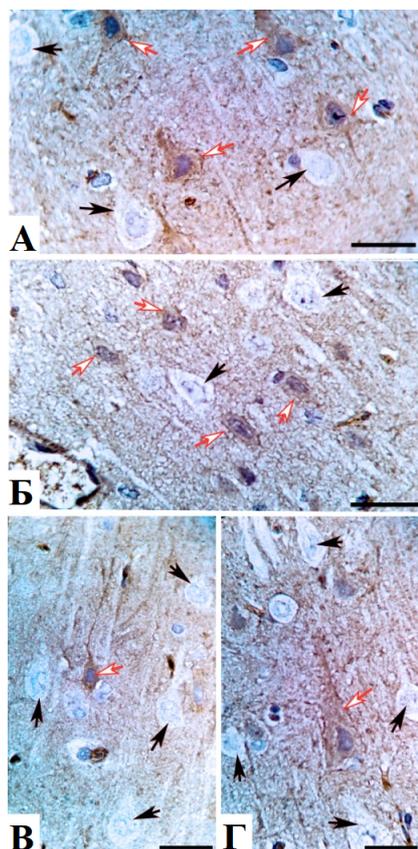
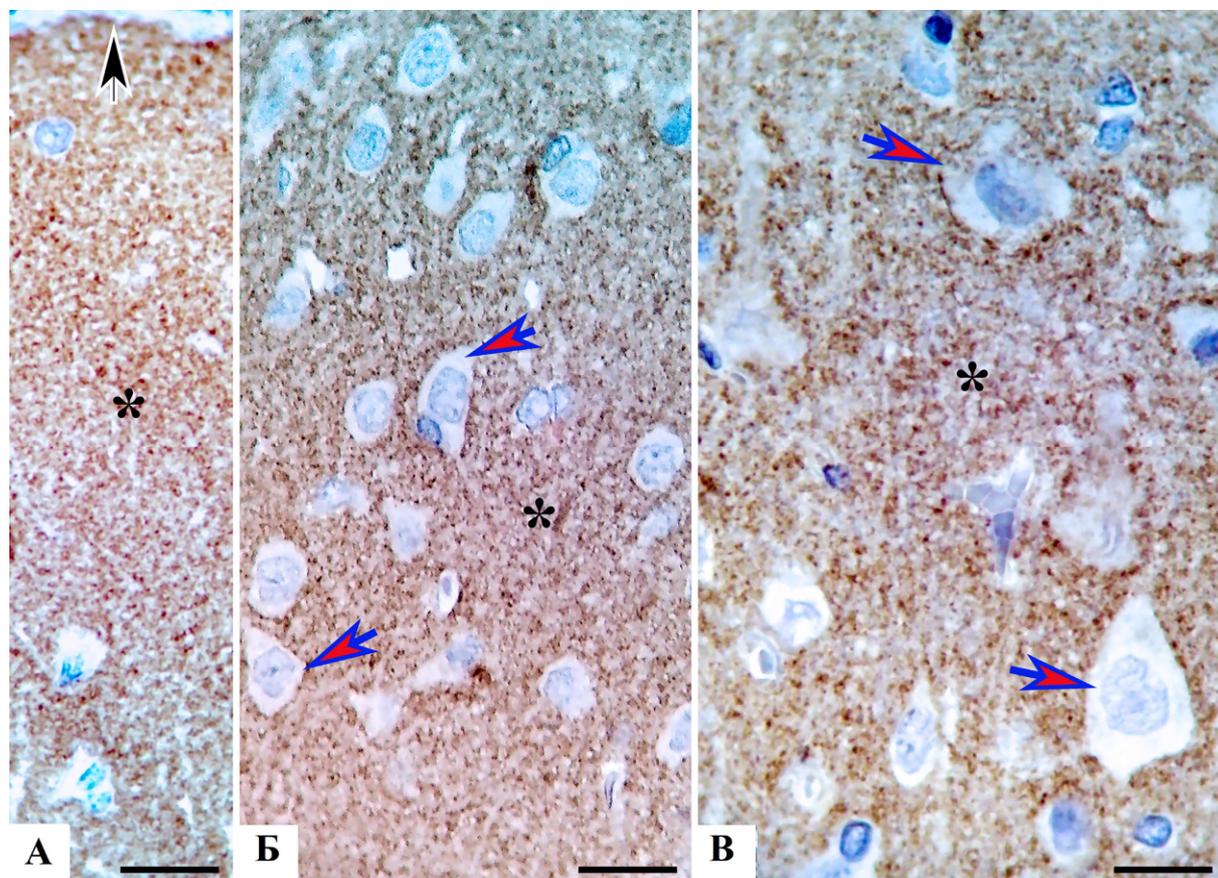


Рисунок 33 – Слой V СМК мозга крыс при реакции на специфический нейромаркер (NSE): высокая плотность типированного белка в пирамидных нейронах (белые стрелки), низкая плотность (черные стрелки) через 1 сут (А), 3 сут (Б), 7 сут (В) и 30 сут (Г) после ПОСА. Окраска: NSE, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала – 20 мкм

По результатам морфометрического исследования происходило статистически значимое изменение доли NSE-позитивных нейронов на всем протяжении исследуемого срока. Максимальное количество дегенеративно измененных нейронов накапливалось в остром периоде ишемии (1 сут) в слоях III и V СМК мозга крыс. В слое III СМК через 3–14 сут после ПОСА отмечалось статистически значимое прогрессивное снижение доли NSE-позитивных нейронов, а через 30 сут – увеличение (Рисунок 34). В слое V СМК через 3–30 сут после ПОСА отмечалось статистически значимое снижение количества

Визуально можно также определить наличие мелких и крупных очагов отека-набухания в сравниваемых слоях. Они были представлены как участки максимальной яркости изображения (Рисунки 36 и 37).



Примечание: А, Б – контроль, В – через 1 сут после ПОСА. Черная стрелка – наружная (пиальная) поверхность слоя I. Окраска: синаптофизин, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала – 20 мкм.

Рисунок 35 – Нейропил (*) и нейроны (красные стрелки) слоя I (А), III (Б) и V (В) СМК мозга крыс при реакции на специфический нейрональный белок синаптических терминалей (синаптофизин) различные пространственное распределение и плотность типированного белка (коричневые гранулы)

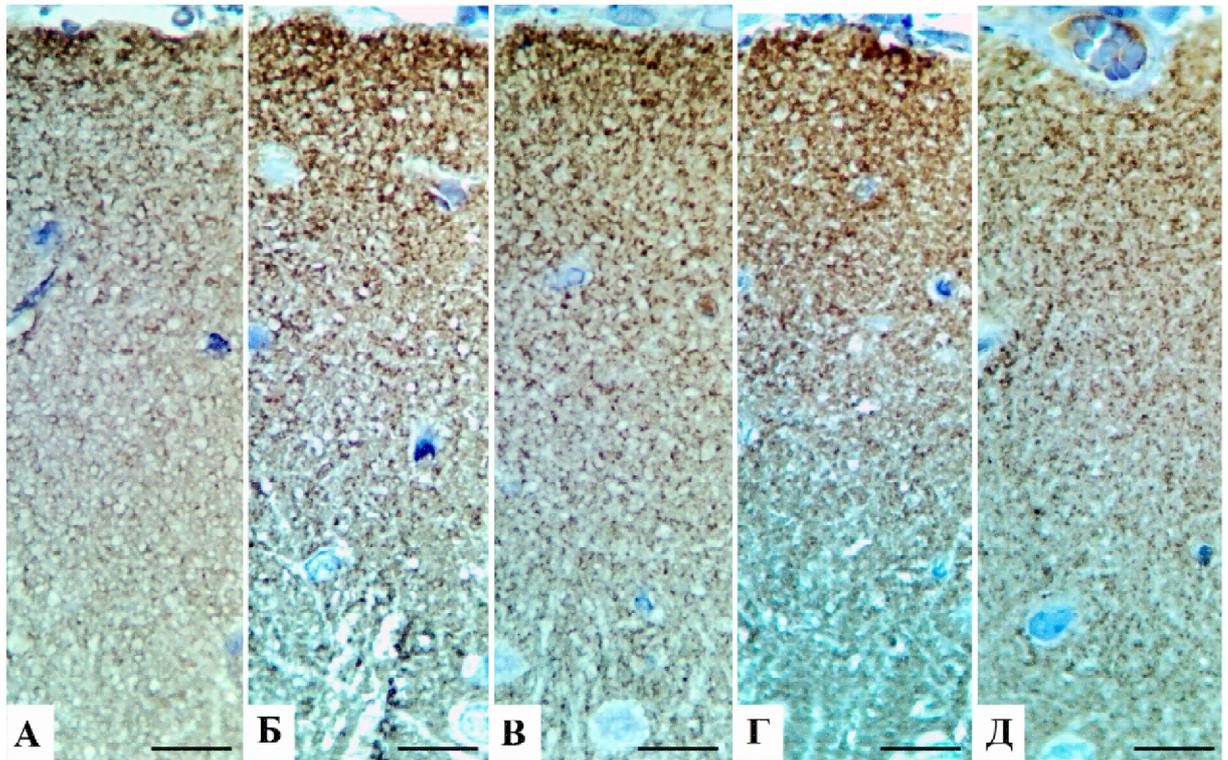


Рисунок 36 – Нейропиль слоя III СМК мозга крыс через 1(А), 3(Б), 7(В), 14(Г) и 30(Д) сут после ПОСА. Разная плотность р38-позитивных терминалей (стрелки) и мелких вакуолей (светлые округлые). Окраска: синаптофизин, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала – 20 мкм

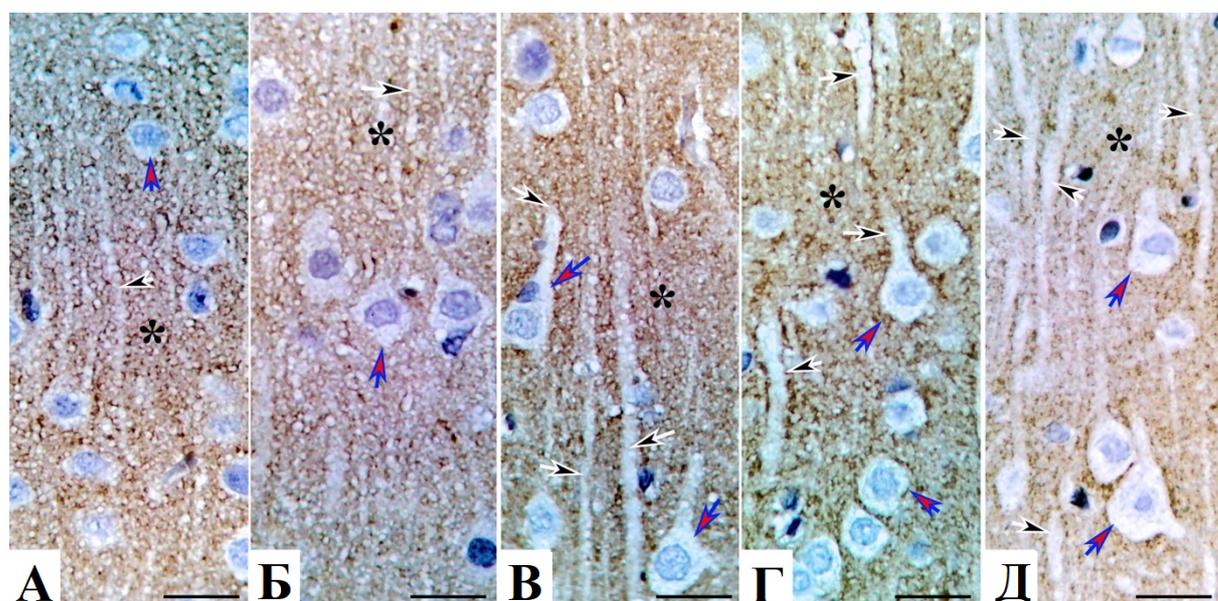
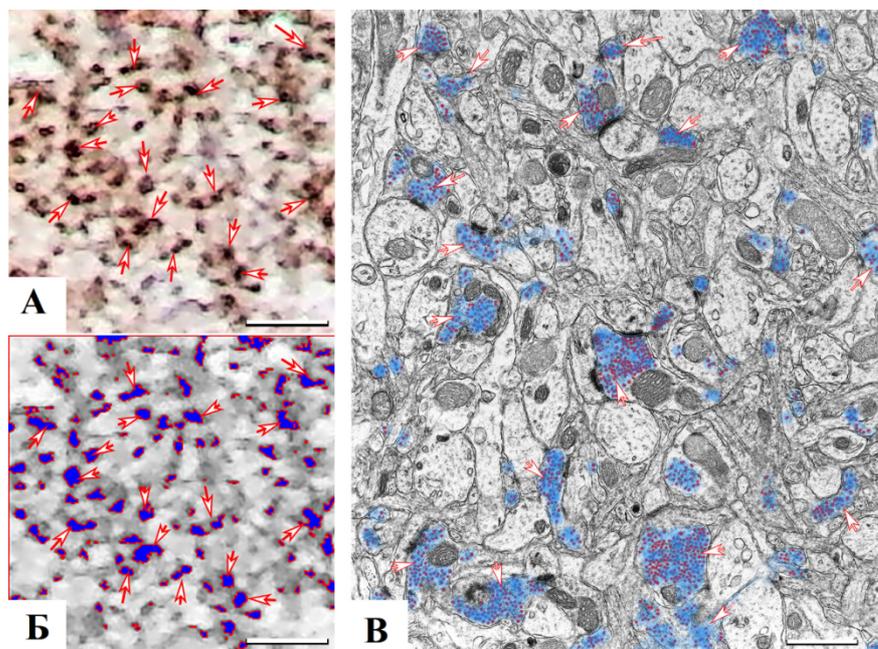


Рисунок 37 – Нейроны (красные стрелки), дендриты (черные стрелки) и нейропиль (*) слоя III СМК мозга крыс через 1(А), 3(Б), 7(В), 14(Г) и 30(Д) сут после ПОСА. Разная плотность р38-позитивных терминалей (коричневые частицы) и мелких вакуолей (светлые округлые). Окраска: синаптофизин, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала – 20 мкм

Для сопоставления результатов иммуногистохимического и ультраструктурного изучения аксональных терминалей проведено сравнение таких морфометрических параметров как общая численная плотность аксональных/синаптических терминалей и относительной площади их срезов. При выявлении р38, сегментирование изображения и выделение контуров терминалей (Рисунок 38 А, Б) показало, что по форме и размерам в мозге контрольных животных они соответствовали зонам распределения синаптических пузырьков (Рисунок 38 В).



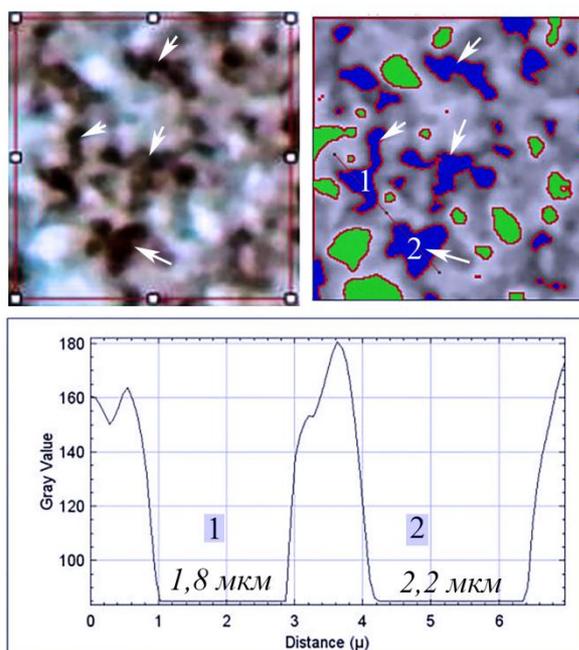
Примечание:

1. Везде стрелками указаны терминалы. На электронограмме отдельные синаптические пузырьки в терминале отмечены красным, а пространственное расположение их скоплений в нейропиле – синим;
2. Терминалы без признаков разрушения, отсутствуют проявления светлого типа деструкции и агглютинации пузырьков.

Рисунок 38 – Синаптические терминалы в нейропиле слоя I СМК животных контрольной группы при иммуногистохимическом – синаптофизин (а) и электронномикроскопическом исследовании – осмирование (в). Типирование синаптофизина (а), объектив $\times 100$, шкала 5 мкм; маска (б) изображения (а); осмирование, контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом, шкала 1 мкм

Однако при определении общей численной плотности терминалей полного количественного соответствия при использованных подходах, закономерно, выявлено не было. Это, вероятно, связано со значительными различиями толщины срезов (2 мкм и 50–70 нм). При иммуногистохимическом исследовании терминалы, находящиеся рядом в пространстве нейропиля, накладывались/сливались друг с другом, образуя крупные конгломераты из нескольких пресинаптических зон. При этом, в процессе морфометрического

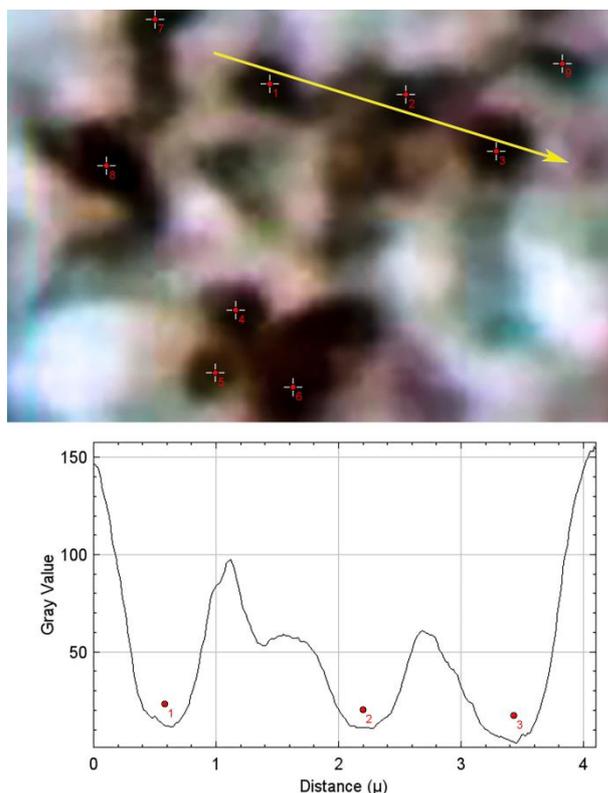
анализа, в сравнении с электронограммами, увеличивался размер одной видимой терминали и уменьшалась их плотность (Рисунок 39).



Примечание: Везде стрелками указаны терминали, зеленые участки – отростки астроцитов или дендритов. Конгломераты соседних синаптических терминалей (для графика) отмечены числами «1» и «2», ниже даны размеры отрезков линии их сечения на Plot Profile.

Рисунок 39 – p38-позитивные синаптические терминали (коричневые и белые стрелки) и их маски (синие и белые стрелки) в слое I СМК животного контрольной группы – синаптофизин. Объектив $\times 100$, ROI – 10×10 мкм

На микрофотографиях видно, что для сегментирования конгломератов синаптических терминалей необходимо применение дополнительных цифровых методов, позволяющих разделять пиксели терминалей и окружающего пространства, незначительно отличающихся по яркости (на 30–40). Для этого идеально подходят фильтры ImageJ 1.52 – «Enhance Contrast», «Subtract Background», «Find Maxima» с различием яркости 30, плагин FindFoci. При использовании Find Maxima в каждом конгломерате терминалей удалось выявить несколько максимумов яркости (Рисунок 40).



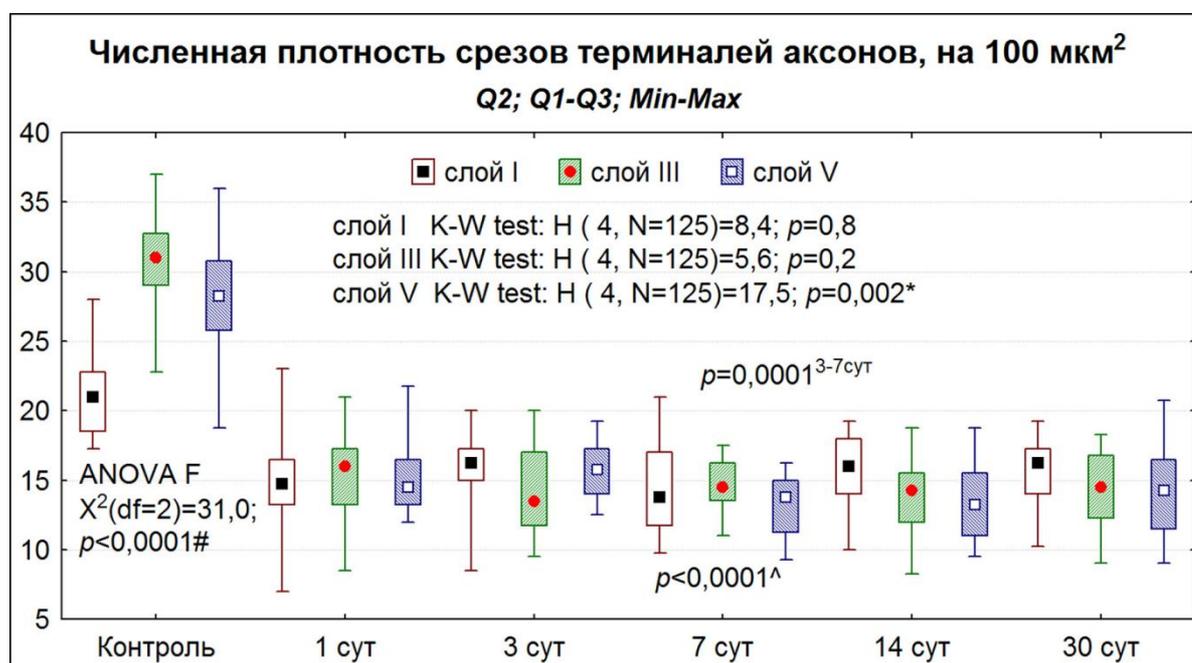
Примечание: Крестиками отмечены участки максимальной плотности маркера на срезе конгломератов синаптических терминалей. На графике (Plot Profile) числами «1», «2» и «3» отмечены соответствующие пики изображения вдоль направления желтой линии.

Рисунок 40 – p38-позитивные синаптические терминали (коричневые) в слое I СМК животного контрольной группы – синаптофизин. Объектив $\times 100$

С учетом представленного выше подхода был проведен морфометрический анализ общей численной плотности p38-позитивных терминалей по плотности максимумов яркости (после инвертирования изображения). Установлено, что в контроле общая численная плотность терминалей нейропиля в СМК варьировалась от 18 (Min) до 37 (Max) на 100 мкм^2 (Рисунок 41). Это было меньше (критерий Манна – Уитни; $p = 0,001$), чем при ультраструктурном исследовании контрольного материала – 40,6 (29,4–44,8) мкм^2 ($Q2$, $Q1$ – $Q3$). При ультраструктурном исследовании выявлялось больше мелких терминальных ветвей аксонов.

После ПОСА во всех слоях СМК общая плотность терминалей статистически значимо уменьшалась уже через 1 сут (в слоях I СМК – на 28,6 %,

III СМК – 46,9 %, V СМК – 46,4 %) и сохранялась примерно на этом уровне в течение всего наблюдения (см. Рисунок 41).



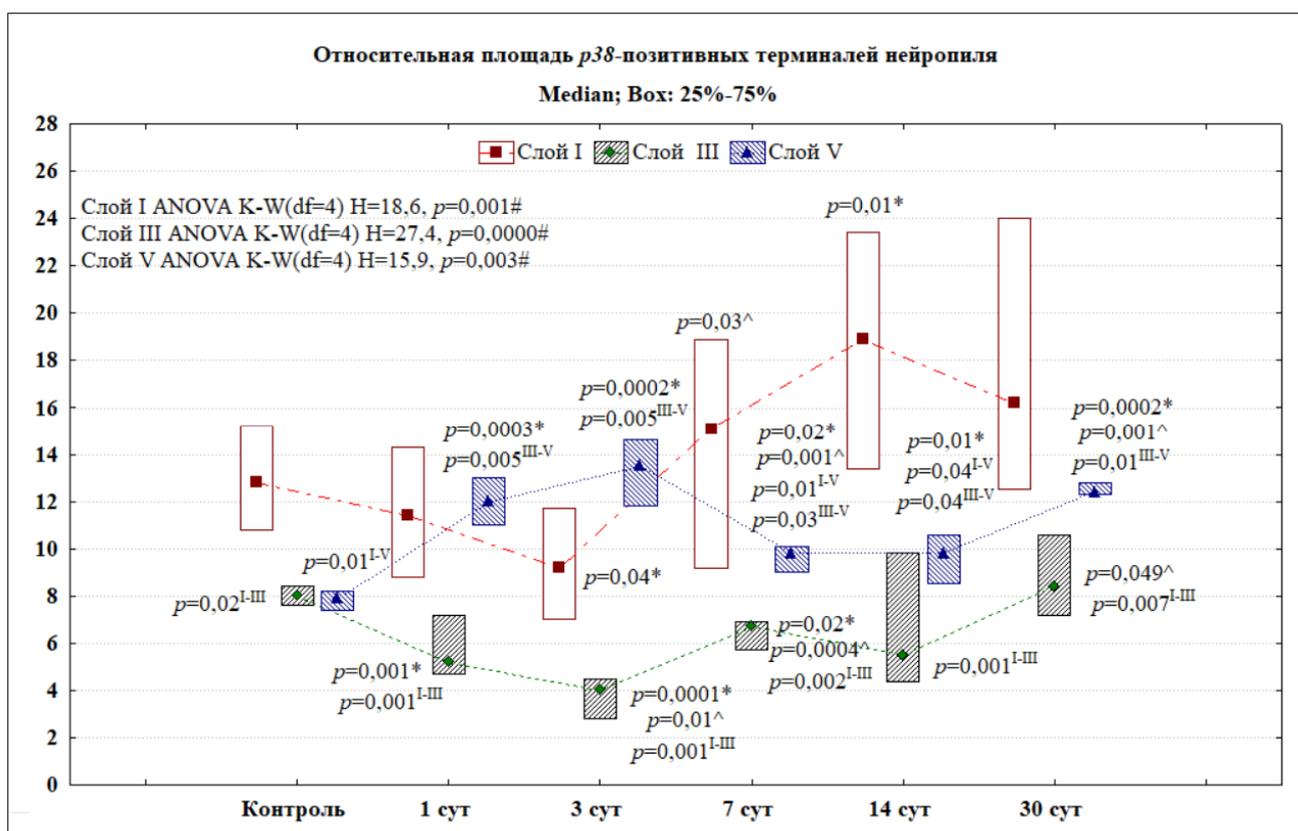
Примечания: ANOVA F и K–W – соответственно однофакторный дисперсионный анализ Фридмана для зависимых и Краскела – Уоллиса для независимых выборок; * – различия между сроками в слое V СМК статистически значимы (ANOVA Kraskel – Wallis); ^ – различия в сравнении с контролем для всех сроков значимы при $p < 0,0001$ (Mann – Whitney U-test); # – различия между слоями в контроле значимы (ANOVA Friedman test). Q2 – медиана (50 %), Q1–Q3 – интерквартильный размах (25–75 %), Min–Max – весь диапазон значений показателя.

Рисунок 41 – Общая численная плотность р38-позитивных синаптических терминалей в слоях I, III и V СМК животных контрольной группы и после ПОСА

Таким образом, с помощью цифровой обработки соседних пикселей изображения удалось частично решить проблему «скрытых» терминалей при иммуногистохимическом исследовании. Однако очень мелкие терминали (около 0,25 мкм) не сегментировались, вероятно, в силу физических ограничений разрешающей способности светового микроскопа. Тем не менее, при использовании реакции на р38 удалось выявить статистически значимое уменьшение общей численной плотности терминалей после ПОСА. Аналогичный

эффект острой ишемии выявлен нами и при электронномикроскопическом исследовании [71].

С помощью анализа гистограмм распределения пикселей изображений нейропиля удалось выявить относительную площадь терминалей нейропиля. Уменьшение общей численной плотности терминалей после ПОСА сопровождалось статистически значимыми изменениями их размеров и относительной площади. Однако динамика этих изменений была не такая однозначная и различалась по срокам и слоям. В большей степени деструкции подвергались синаптические пузырьки терминалей в нейропиле слоя III СМК. Именно в этом слое выявлены самые низкие значения переменной. В слое I и V СМК мозга крыс отмечалась явная тенденция, вероятно, адаптивного формирования крупных терминалей, в сравнении с контролем: в слое I СМК – через 14 сут, а в слое V СМК – через 1, 3, 7, 14 и 30 сут (Рисунок 42).



Примечание: * – различия в сравнении с контролем статистически значимые при $p < 0,05$; ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test), I–III, I–V, III–V – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test) при $p < 0,02$. # – различия между всеми сроками после ПОСА статистически значимы по результатам однофакторного множественного анализа (ANOVA Kraskel – Wallis). ОПТ – относительная площадь терминалей. Материал представлен как медиана и интерквартильный разброс.

Рисунок 42 – Относительная площадь p38-позитивных терминалей нейропиля различных слоев сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме и после ПОСА, $Q2 (Q1-Q3)$

Полученные при иммуногистохимическом исследовании данные можно объяснить ультраструктурными изменениями терминалей: отек-набухание терминалей, деструкция и агглютинация синаптических пузырьков с их смещением и сморщиванием, а также разрушение цитоскелета и митохондрий. В большей степени эти изменения проявлялись в слое III СМК (Рисунок 43 А, Б). Мы полагаем, что именно за счет этого в слое III СМК выявлялись небольшие

скопления р38-позитивного материала (см. Рисунок 41) при практически равной их общей численной плотности (см. Рисунок 42).

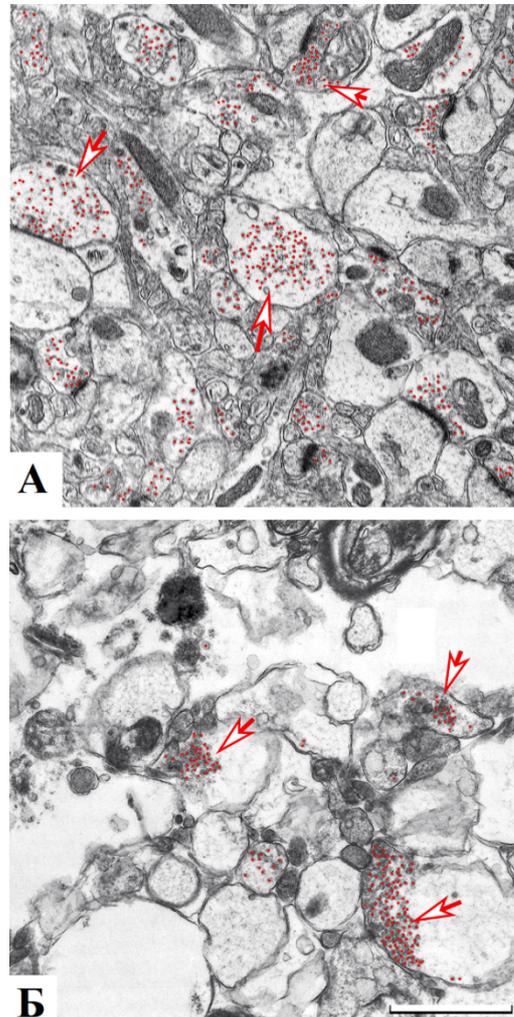


Рисунок 43 – Синаптические терминалы (А, Б) в нейропиле слоя I (А) и III (Б) СМК через 1 (А) и 3 (Б) сут после ПОСА: различные проявления отека-набухания структур нейропиля, агглютинации и деструкции синаптических пузырьков (красные точки) с умеренным (А) и выраженным (Б) уменьшением их количества в терминалях (стрелки). Окраска: осмирование, контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом, шкала 1 мкм

О значительном увеличении неоднородности терминалий по содержанию р38-позитивных синаптических пузырьков свидетельствовали и данные иммуногистохимического исследования (Рисунок 44 А, Б, В). Типирование

терминалей по степени яркости и размерам (показатель – «общая интенсивность пикселей в пике», плагин FindFoci) показало, что после ПОСА увеличивалось (до 40–70 % от общего количества) содержание бледных профилей терминалей (см. Рисунок 44 В). Высокое содержание бледных терминалей, вероятно, подверженных светлomu (отечному) типу деструкции, отмечалось на протяжении всего периода наблюдения. В контроле преобладали терминали с высоким содержанием р38.

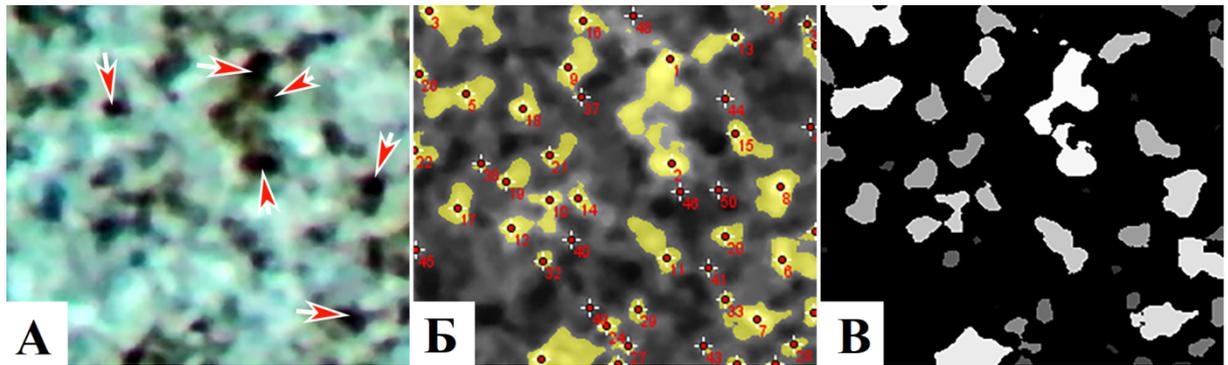


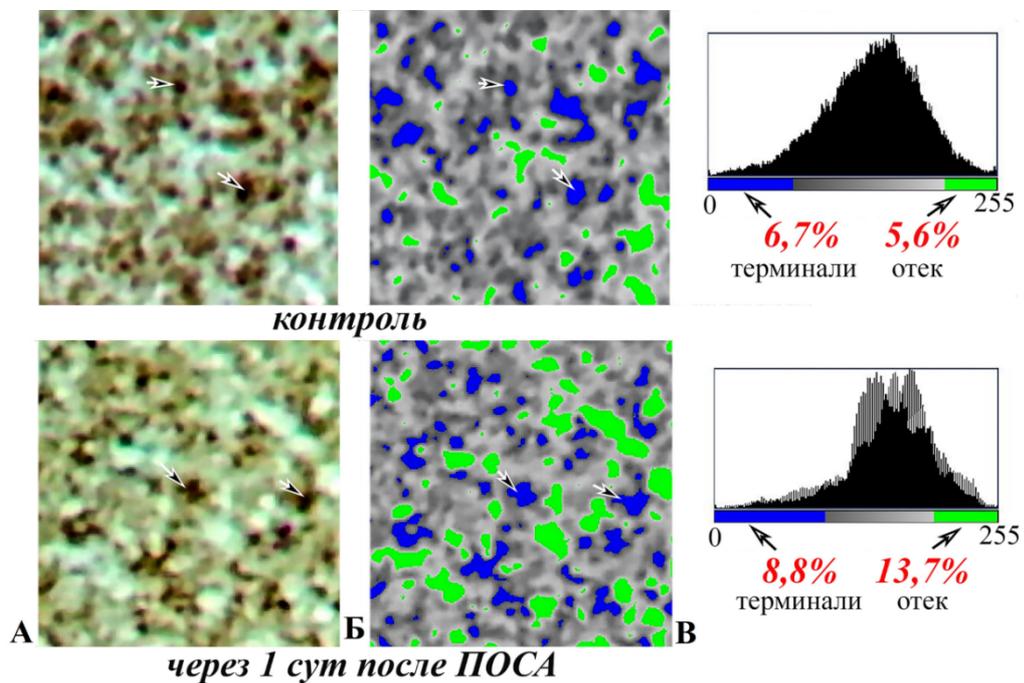
Рисунок 44 – р38-позитивные синаптические терминали (А, стрелки) в слое I СМК через 1 сут после ПОСА – синаптофизин. Точками отмечены яркие крупные терминали, крестиками – бледные мелкие (Б); с помощью оттенков серого (В) показано более точное типирование терминалей по содержанию белка р38.

Объектив $\times 100$; плагин FindFoci

С помощью анализа гистограмм распределения пикселей изображений нейропиля (зоны интересов 400 мкм^2) удалось выявить относительную площадь терминалей, а также относительную площадь зон отека-набухания нейропиля. Основные этапы данного подхода представлены на рисунке (Рисунок 45).

Установлены статистически значимые изменения изученных морфометрических независимых переменных в сравнении с контролем и в динамике наблюдения (1–30 сут) (Рисунок 46). Были отмечены пики увеличения относительной площади терминалей и очагов отека-набухания, а также их стохастические связи.

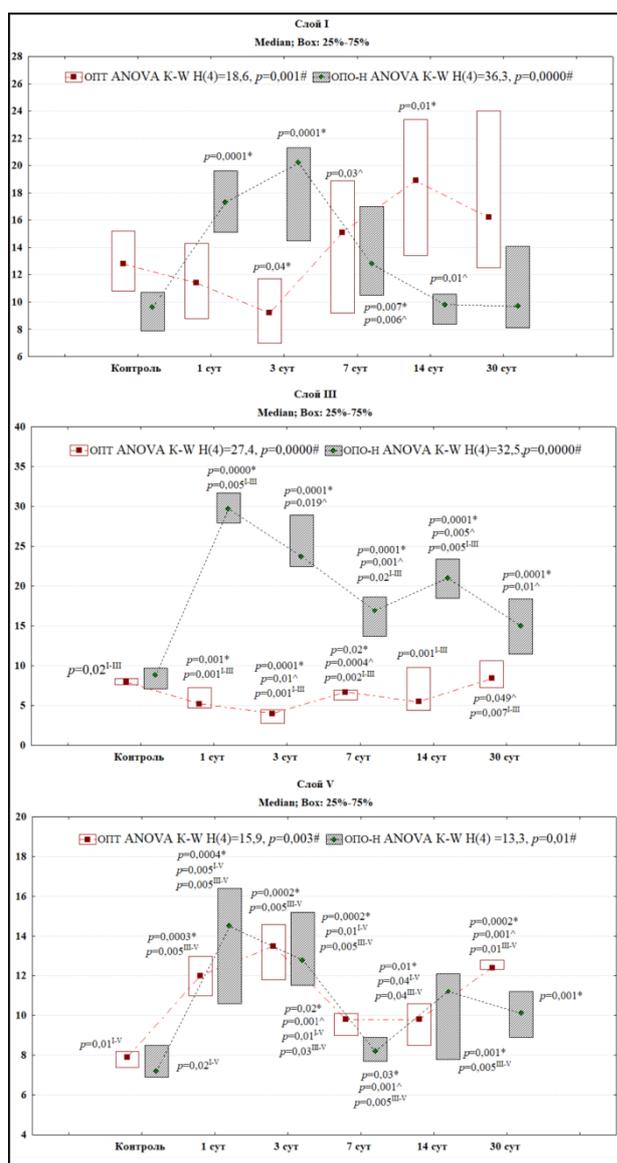
По данным ANOVA Фридмана, используемого для множественного сравнения связанной переменной, установлено, что относительная площадь р38-позитивного материала (площадь синаптических терминалей) в сравниваемых слоях СМК ($df = 2$) статистически значимо различалась во всех группах. Максимально переменная различалась в остром периоде, когда отмечались самые высокие значения критерия χ^2 и низкий p -уровень: контроль ($\chi^2 = 6,9$; $p = 0,03$), 1 сут ($\chi^2 = 15,2$; $p = 0,001$), 3 сут ($\chi^2 = 15,2$; $p = 0,001$), 7 сут ($\chi^2 = 11,4$; $p = 0,003$), 14 сут ($\chi^2 = 12,8$; $p = 0,002$), 30 сут ($\chi^2 = 10,9$; $p = 0,004$).



Примечание: А – исходные ROI (400 мкм², RGB, фильтр Enhance Contrast), Б – после обработки изображения в Threshold (селекция меток синаптофизина и очагов отека), В – гистограмма распределения пикселей изображения ROI с указанием их количества и яркости. Стрелки на ROI – терминали на разных этапах анализа. Синий цвет – терминали, зеленый – очаги отека. Окраска: синаптофизин, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; сторона ROI – 20,0 мкм (площадь – 400 мкм²).

Рисунок 45 – Методическая основа получение количественных данных (относительная площадь терминалей и мелких очагов отека, %) для нейропилия слоя I СМК мозга крыс с помощью программы ImageJ 1.53

При этом результаты анализа относительной площади отека-набухания нейропиля сравниваемых слоев также показали более высокий уровень различий этой переменной именно в остром периоде: контроль ($\chi^2 = 2,1$; $p = 0,4$), 1 сут ($\chi^2 = 20,0$; $p = 0,0001$), 3 сут ($\chi^2 = 18,2$; $p = 0,0001$), 7 сут ($\chi^2 = 13,4$; $p = 0,001$), 14 сут ($\chi^2 = 15,8$; $p = 0,0004$), 30 сут ($\chi^2 = 2,7$; $p = 0,26$). Парное сравнение позволило отвергнуть нулевую гипотезу по этим переменным (см. Рисунок 46, критерий Вилкоксона). Однако, в отличие от площади терминалей, гетероморфность проявлений отека-набухания в нейропиле изученных слоев через 30 сут после ПОСА не отличалась от контроля. Вероятно, в этот период происходило частичное восстановление водного и ионного баланса клеток всего объема СМК.



Примечание: * – статистически значимые различия в сравнении с контролем при $p < 0,05$; ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test), ^{I-III, I-V, III-V} – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test) при $p \leq 0,02$. # – различия между всеми сроками после ПОСА статистически значимы по результатам однофакторного множественного анализа (ANOVA Kraskel – Wallis). ОПТ – относительная площадь терминалей, ОПО-Н – относительная площадь зон отека-набухания. Материал представлен как медиана и интерквартильный разброс.

Рисунок 46 – Относительная площадь r38-позитивных синаптических терминалей и мелких очагов отека-набухания нейропиля различных слоев СМК мозга крыс в норме и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3)

По данным парного корреляционного анализа (Спирмена) периода наблюдения (1–30 сут), между независимыми переменными (относительная площадь терминалей и зон отека-набухания нейропиля) в слоях I и III СМК мозга крыс выявлены средняя и слабая отрицательная связи (соответственно: $R = -0,52$, $p = 0,0000$ и $R = -0,47$, $p = 0,004$). Для слоя V СМК мозга крыс характерна средняя положительная связь ($r = 0,54$, $p = 0,0004$). Это свидетельствовало о влиянии на связи факторов, зависящих от разной реакции на ПОСА отдела СМК. В контроле (всех слоев) значимых связей между этими переменными не было выявлено.

Существенно то, что в слое I СМК через 1 сут после ПОСА выявлена средняя положительная корреляционная связь ($R = 0,58$, $p = 0,02$), а в другие сроки – отрицательная: 3 сут ($R = -0,59$, $p = 0,02$), 7 сут ($R = -0,56$, $p = 0,02$), 14 сут ($R = -0,64$, $p = 0,04$) и 30 сут ($R = -0,50$, $p = 0,04$). Для слоя III СМК значимые связи по срокам были выявлены только через 3 сут ($R = -0,94$, $p = 0,005$), но по характеру они соответствовали слою I СМК. Вероятно, это свидетельствовало об изменении в этих слоях через 3 сут причинно-следственных связей или появлении новых дискриминирующих факторов – например, компенсаторная активация образования новых синаптических пузырьков и терминалей, гипертрофия отростков астроцитов субпиальной зоны. Особенностью слоя V СМК было наличие сильной ($R = -0,90$, $p = 0,0003$) через 3 сут и средней отрицательной ($R = -0,68$, $p = 0,03$) через 7 сут. Таким образом, можно предположить, что 3 и 7 сут были каким-то критическим периодом после ПОСА, когда изменялись соотношения основных процессов патологии и саногенеза. Существенно то, что эти изменения имели индивидуальные послонные особенности, что отражалось в характере и силе стохастических связей по срокам.

Для оценки влияния сравниваемых переменных друг на друга использовали множественный регрессионный анализ. Проверку условий независимости наблюдений друг от друга проводили с помощью критерия Durbin – Watson. В нашем исследовании данный критерий составлял 1,5–2,0 (допустимые значения от 1 до 3), что свидетельствовало о корректности результатов. Анализ показал,

что через 3 сут после ПОСА (период максимально сильных связей между переменными) в слое I СМК изменение площади зон отека-набухания на 1 % приводило к изменению площади терминалей на 0,57 %, в слое III СМК – на 0,31 %, слое V СМК – на 0,72 %. При этом коэффициент детерминации моделей составил 34 % ($p = 0,02$), 72 % ($p = 0,03$) и 80 % ($p = 0,01$). То есть, через 3 сут в слое I СМК только 34 % относительной площади зон отека-набухания нейропиля можно было объяснить светлым (отечным) типом деструкции терминалей этого слоя, а 66 % были, вероятно, обусловлены гидропическими изменениями отростков астроцитов и мелких дендритов. В слоях пирамидных нейронов (слои III и V СМК) по светлому типу деструкции, вероятно, изменялось значительно больше терминалей – коэффициент детерминации 72 и 80 %. Подобные различия уровней СМК мы связываем с тем, что в молекулярном слое содержится существенно больше отростков фиброзных астроцитов [1]. Это, вероятно, позволяло эффективно осуществлять реабсорбцию воды из отечных терминалей, препятствуя их необратимой гибели по светлому типу деструкции. С другой стороны, в слое III СМК, для которого были характерны максимальные проявления отека-набухания нейропиля, было выявлено и максимальное уменьшение относительной площади r38-позитивного материала. Очевидно, в этом слое происходил срыв механизмов реабсорбции воды с последующим разрушением синаптических пузырьков и терминалей в целом. Эти результаты наглядно демонстрируют плеiotропность гидропических изменений: с одной стороны – проявления дистрофии, с другой – необходимое условие санации ишемически измененной ткани (регуляция концентрации лактата, супероксидных радикалов и других токсических продуктов катаболизма).

Таким образом, по данным иммуногистохимического и ультраструктурного исследования, после ПОСА в течение всего периода наблюдения (30 сут) сохранялись выраженные проявления гипергидратации нейропиля СМК. Это, вероятно, приводило к перманентному разрушению преимущественно мелких веточек аксональных терминалей, что проявлялось уменьшением общей численной плотности пресинаптических зон (во всех слоях) и их относительной

площади (слои I и III). В слое V СМК, в силу до конца неизученных факторов, изменялась локализация синаптических пузырьков, но без их значительного разрушения.

Полученные в работе данные послужат для уточнения особенностей структурно-функциональной реорганизации аксональных терминалей разных слоев СМК после ПОСА. Выявленные различия могут быть связаны с особенностями нейро-глиальных отношений изученных слоев СМК – атрофией и гипертрофией астроцитов по типу обратимого реактивного глиоза.

3.4 Иммуногистохимическая характеристика глиальных клеток

После необратимо двусторонней ПОСА происходила реорганизация глиальных клеток, что имело отражение при исследовании препаратов, окрашенных иммуногистохимическими реактивами. IBA1 (кальций-связывающий белок, специфичный для микроглии) обнаруживается в телах и отростках микроглиоцитов и принимает участие в реорганизации цитоскелета и активации микроглии. Это делает возможным оценить функциональную активность микроглиальных клеток. По данным иммуногистохимического типирования IBA1, в слоях III и V СМК происходило изменение формы микроглиоцитов до округлой или овальной и пространственная реорганизация отростков. Активация микроглиоцитов в слоях III и V СМК происходила в острый период ишемии (1 и 3 сут) (Рисунок 47). Затем происходило снижение доли активированных форм микроглиальных клеток. Изменения доли активированных форм микроглиоцитов происходило одновременно с изменением их пролиферативной активности. В острый период ишемии (1 и 3 сут) после ПОСА в слоях III и V СМК отмечено статистически значимое увеличение численной плотности микроглиальных клеток выше контрольных значений (Mann – Whitney U-test; $p = 0,0001$) (см. Рисунок 30). Через 7–30 сут с момента начала ишемии отмечено снижение численной плотности микроглиальных клеток (см. Рисунок 30).

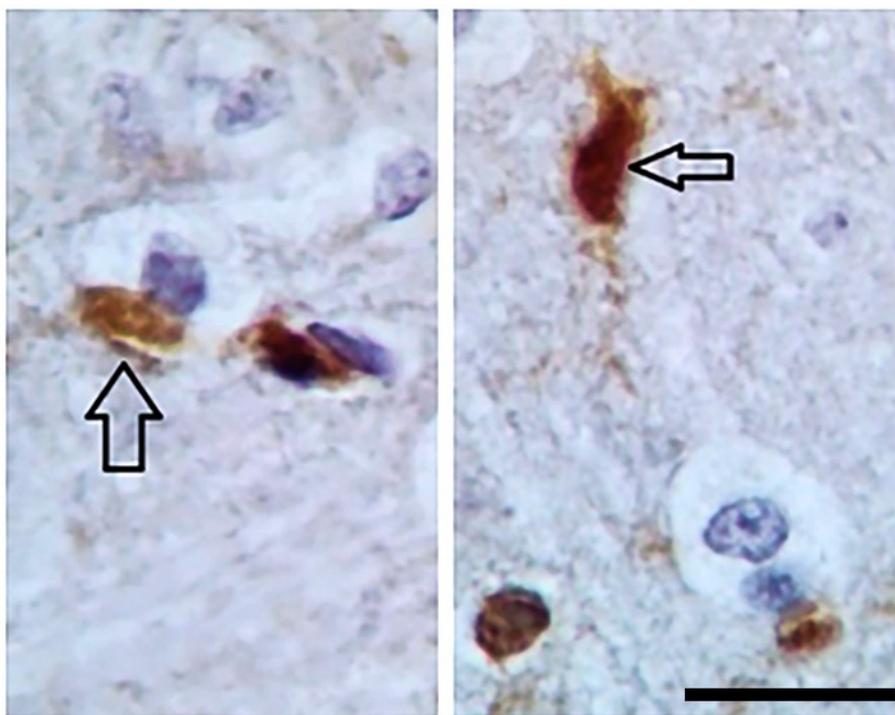


Рисунок 47 – Микроглиоциты через 1 сут после ПОСА: вытянутая форма тел микроглиоцитов. Стрелка – указанные проявления. Окраска: IBA1.

Объектив $\times 100$; шкала – 20 мкм

По данным иммуногистохимического изучения распределения GFAP-позитивного материала на фронтальных срезах СМК в контроле выявлено однородное распределение хромогена с максимальной концентрацией вокруг кровеносных капилляров и в молекулярном слое (Рисунок 48). GFAP-позитивный материал локализовал в телах и отростках протоплазматических и волокнистых астроцитов. Относительная площадь GFAP-позитивного материала в слое I СМК – 16,6 %, в слое III СМК – 13,7 %, в слое V СМК – 15,9 %.

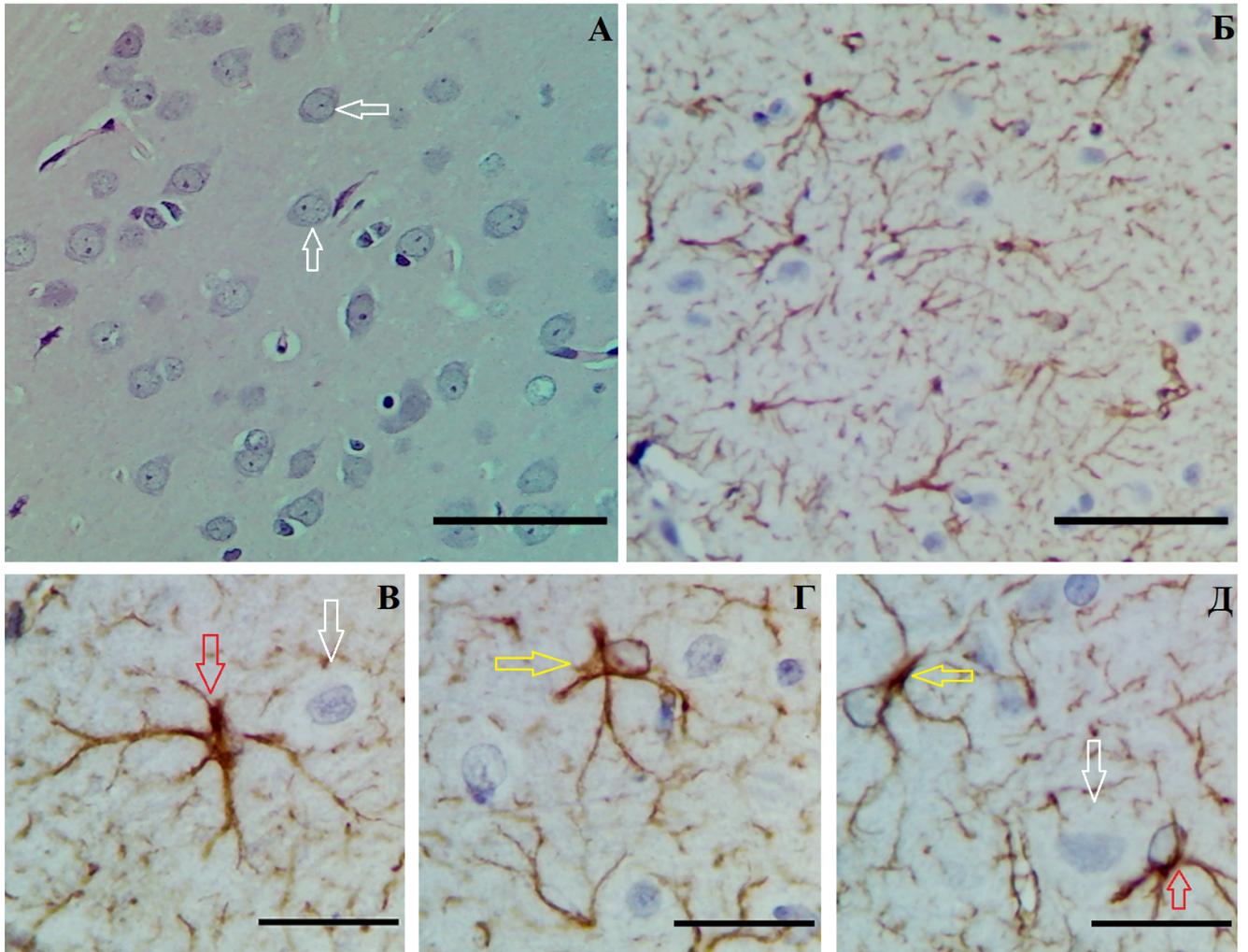


Рисунок 48 – Слой III СМК (А, Б, В, Г) и слой V СМК (Д) контрольной группы:
 А – нормохромные нейроны (белые стрелки) и нейропиль (*); Б – равномерное распределение хромогена; протоплазматические (красные стрелки) и волокнистые (желтые стрелки) астроциты. Окраска: гематоксилин-эозином (А); GFAP (Б, В, Г, Д).

Объективы $\times 40$ (А, Б), $\times 100$ (В, Г, Д), шкала – 25 мкм

В сером веществе СМК различают волокнистые и протоплазматические астроциты. Для волокнистых астроцитов характерно небольшое тело с длинными и слабоветвленными отростками, имеют древовидную организацию, высокая плотность GFAP-позитивного материала содержится в отростках (см. Рисунок 48 Г, Д). Протоплазматические астроциты отличались крупным телом, толстыми и короткими отростками (см. Рисунок 48 В, Д). Оба вида астроцитов встречались в слоях III и V СМК мозга крыс. Пространственная организации отростков

астроцитов представляла типичную древовидную структуру, занимающую определенный пространственный домен, на территории которого на фронтальных серийных срезах видно тело астроцита с толстыми и тонкими отростками (Рисунок 49).

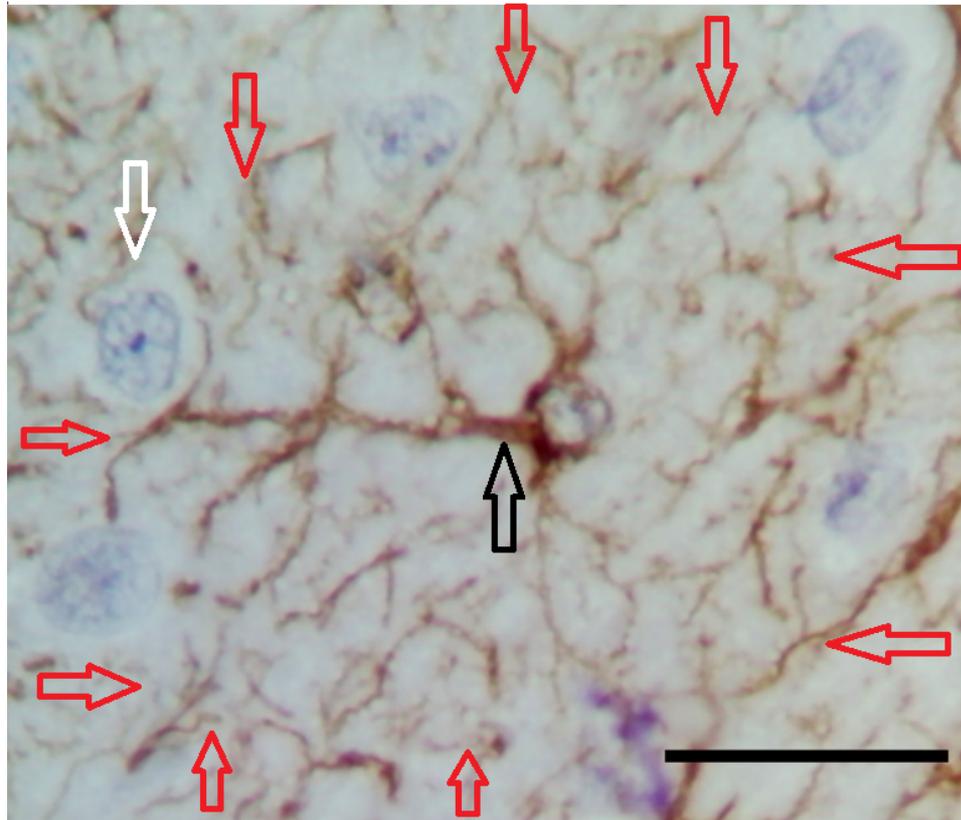


Рисунок 49 – Слой III СМК: зона пространственного домена одного астроцита (красные стрелки); нейроны (белая стрелка); астроцит и крупные отростки (черная стрелка). Окраска: GFAP. Объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм

Для того, чтобы оценить степень реакции астроцитов на гипоперфузию головного мозга после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий, помимо измерения относительной плотности GFAP, также необходимо изучить пространственное распределение маркера GFAP в контроле и в постишемическом периоде. С этой целью мы использовали фрактальный анализ, с помощью которого мы смогли дать количественную оценку сложности формы

астроцитарных отростков и степень заполненности ими окружающего пространства (слои и поля СМК).

По полученным в ходе фрактального анализа данным, в контрольной группе показатели заполнения фрактального пространства фрактальными структурами (телами и отростками астроцитов) при иммуногистохимическом исследовании препаратов, окрашенных на GFAP, в разных слоях СМК статистически значимо различались.

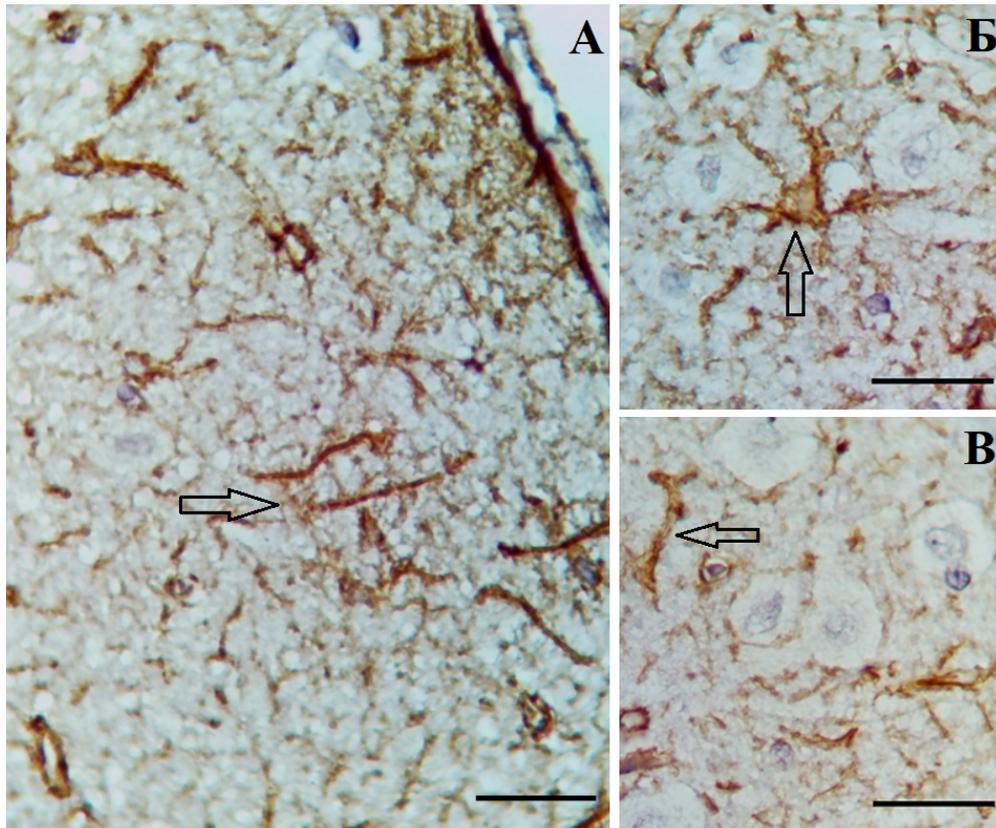


Рисунок 50 – СМК головного мозга крыс через 1 сут после необратимой двусторонней ПОСА: А – скопление волокнистых астроцитов в слое I СМК; Б – протоплазматический астроцит с толстыми отростками в слое III СМК; В – волокнистые астроциты с толстыми первичными отростками слоя V СМК.

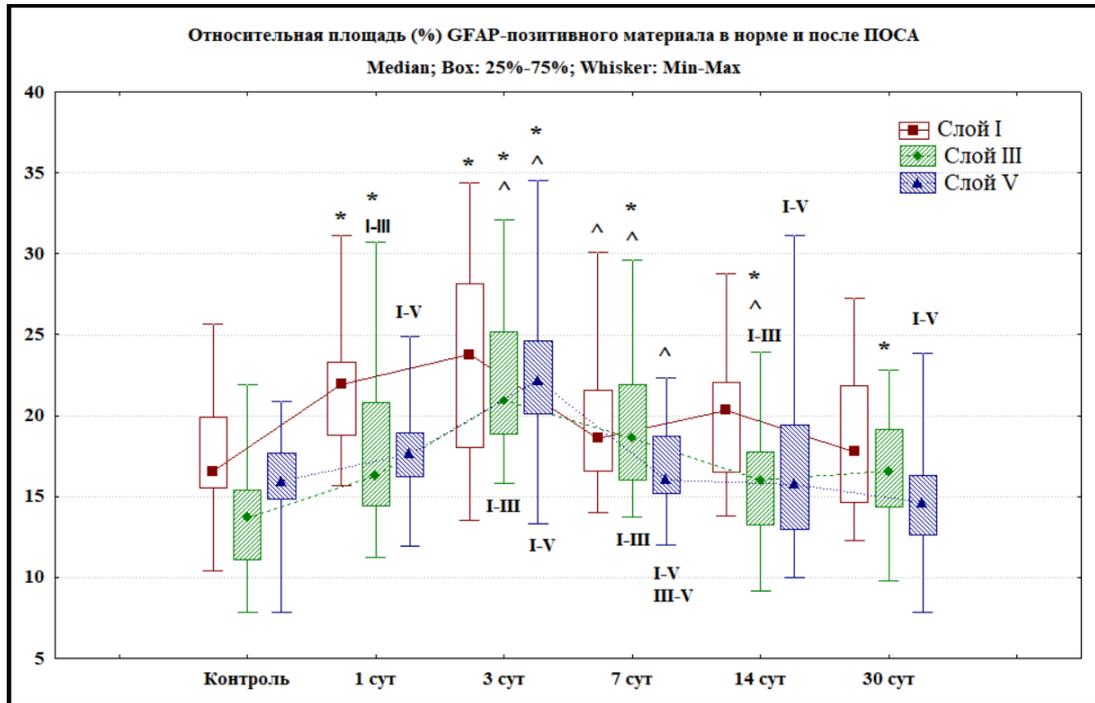
Стрелки – указанные проявления. Окраска: GFAP. Объектив $\times 100$,

шкала – 25 мкм

По результатам иммуногистохимического исследования относительной площади GFAP-позитивного материала установлено увеличение локального содержания маркера GFAP уже через 1 сут после необратимой двусторонней ПОСА. Максимальное содержание маркера GFAP содержалось в молекулярном слое СМК и составило 21,9 % (Q2, Q1–Q3: 18,9 – 23,3 %), здесь преобладали фиброзные астроциты (Рисунок 50 А). Минимальное содержание отмечено в слое V СМК – 17,6 % (Q2, Q1–Q3: 16,3–18,9 %). Значения в разных слоях статистически значимо отличались (Wilcoxon test между слоем I и слоем III СМК – $p < 0,005$, между слоем I и слоем V СМК – $p < 0,01$) (Рисунок 51). Через 1 сут после ПОСА происходило увеличение содержания реактивно измененных астроцитов с большим числом толстых отростков (гипертрофия отростков) с высокой очаговой плотностью распределения и усложнением фиброархитектоники. Эти изменения затрагивали и протоплазматические, и волокнистые астроциты СМК (Рисунок 50).

Через 3 сут после ПОСА установлено максимальное содержание маркера GFAP во всех исследуемых слоях СМК. В слое I СМК – 23,8 %, в слое III СМК – 20,9, в слое V СМК – 22,2 % (см. Рисунок 51). Через 7 сут после ПОСА в слое I СМК установлено статистически значимое снижение относительной площади GFAP до 18,6 % (Mann – Whitney U-test; $p = 0,02$). Через 14 сут в слое I СМК отмечено увеличение относительной площади хромогена (GFAP) элементов глиальной сети СМК до 20,3 % с последующим снижением этого значения до 17,8 % через 30 сут после ПОСА (см. Рисунок 51). В слое III СМК через 7 сут после ПОСА относительная площадь маркера GFAP уменьшается до 18,6 % и имеет статистически значимое различие с 3 сут (Mann – Whitney U-test; $p = 0,02$). Через 14 сут после ПОСА в слое III СМК показатель относительной плотности хромогена статистически значимо снизился до 15,9 % (Mann – Whitney U-test; $p = 0,008$), затем через 30 сут после ПОСА произошло его увеличение до 16,85 % (см. Рисунок 51). В слое V СМК через 7 сут после ПОСА относительная площадь GFAP статистически значимо снизилась до 16,0 % (Mann – Whitney

U-test; $p < 0,001$). Минимальных значений этот показатель в слое V CMK достигал через 30 сут после ПОСА и составил 14,6 % (см. Рисунок 51).



Примечание: * – различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$), I-III, I-V, III-V – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test; $p < 0,05$). При множественном сравнении по срокам (ANOVA Kraskel – Wallis) удалось отвергнуть нулевую гипотезу – слой I CMK ($df = 5$; $N = 18,9$; $p = 0,002$); слой III CMK ($df = 5$; $N = 46,3$; $p = 0,0001$); слой V CMK ($df = 5$; $N = 40,6$; $p = 0,0001$).

Рисунок 51 – Относительная площадь (%) хромогена при GFAP элементов глиальной сети слоя I, III и V CMK в контроле и после ПОСА

Через 7 и 14 сут после ПОСА в CMK отмечены признаки активации олигодендроцитов и астроцитов: пролиферация, гиперплазия (реактивный астроглиоз) и рост отростков, увеличение плотности метки к GFAP (см. Рисунок 51). Через 7 сут в слоях III и V CMK произошел статистически значимый рост численной плотности олигодендроцитов по сравнению с контрольными значениями (Mann – Whitney U-test; $p = 0,008$, $p = 0,001$ и $p = 0,02$) (см. Рисунок 30). Через 14 сут отмечались признаки реактивного астроглиоза (гиперплазия и

пролиферация астроцитов). Численная плотность астроцитов через 14 сут в слоях III и V СМК увеличилась на 4,3 % и 2,6 % соответственно.

По результатам проведения фрактального анализа после ПОСА происходит пространственная реорганизация глиальной сети СМК мозга крыс. Вероятными причинами изменений могут быть деструктивные процессы отростков астроцитов в следствии возникшей гипоперфузии головного мозга, пролиферация и гипертрофия астроцитов. Через 1 сут после ПОСА выявлены статистически значимые изменения фрактальной размерности и лакунарности астроглиальной сети СМК. Фрактальная размерность в сравнении с контролем увеличивалась во всех исследуемых слоях СМК (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$) (Рисунки 53 и 54). Через 3 сут после ПОСА выявлены статистически значимые изменения всех переменных (фрактальной размерности и лакунарности). Происходило статистически значимое увеличение фрактальной размерности во всех исследуемых слоях одновременно со статистически значимым уменьшением лакунарности в слоях I и III СМК (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$). Данные проявления могут свидетельствовать об увеличении площади GFAP-материала (см. Рисунки 51, 53 и 54). Увеличение относительной площади GFAP-материала и увеличение фрактальной размерности астроглиальной сети могут свидетельствовать о гипертрофических процессах, протекающих в отростках астроцитов в ответ на ишемию, и могут быть рассмотрены как компенсаторная реакция астроцитов.

Через 7 сут после ПОСА происходит статистически значимое снижение фрактальной размерности в сравнении с контролем и предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$). Лакунарность достигает максимальных значений в этот период, происходит статистически значимое увеличение этой переменной в сравнении с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$). Это свидетельствует о появлении GFAP-негативных зон. Также имеются статистически значимые различия между слоем III и V (Wilcoxon test; $p < 0,05$).

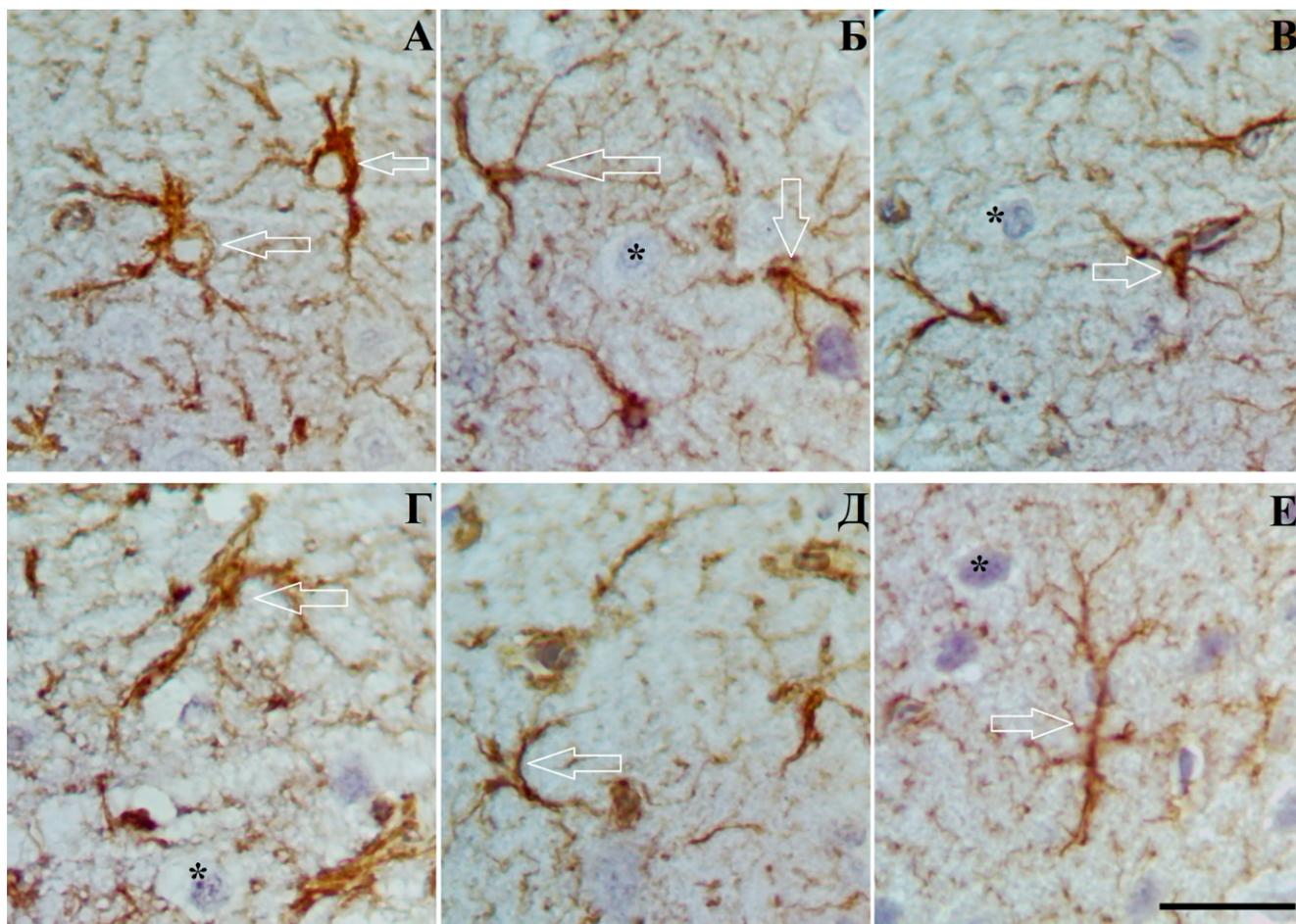
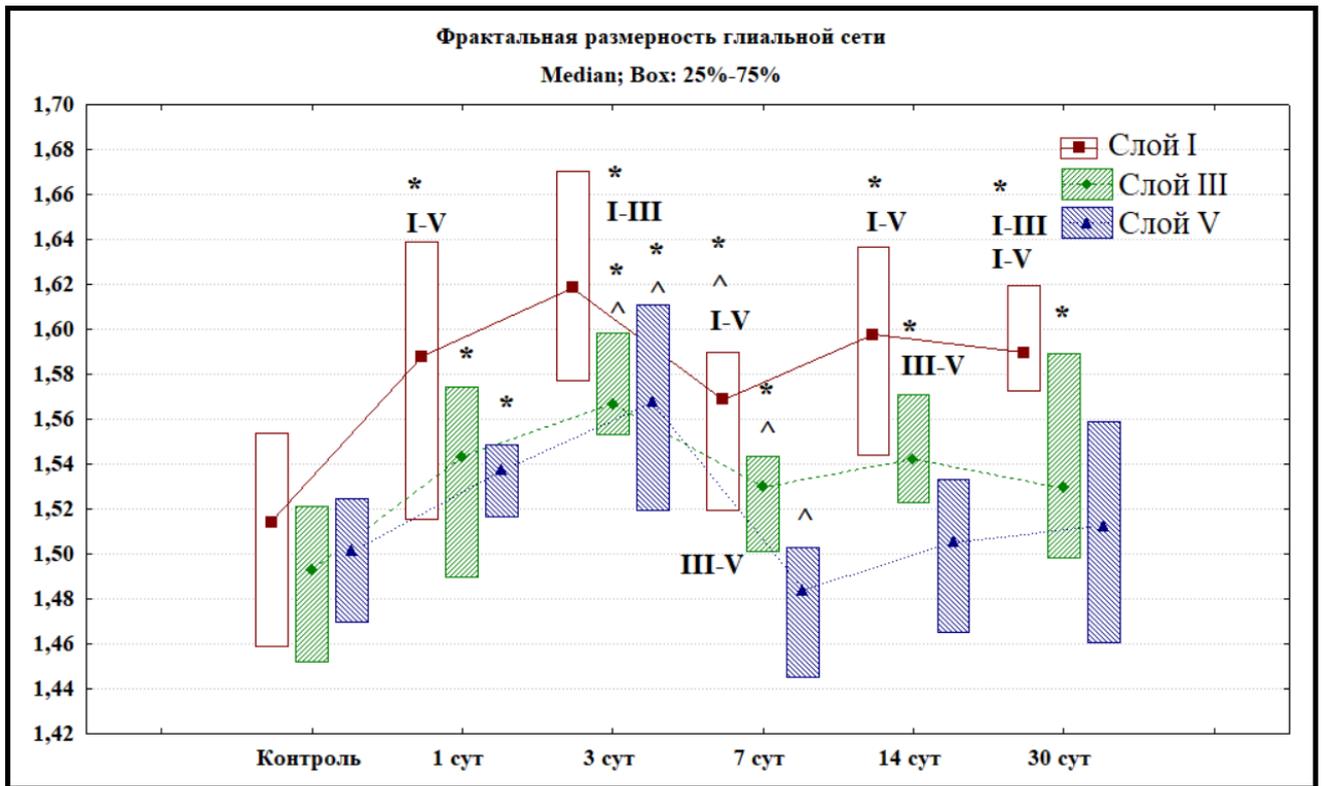


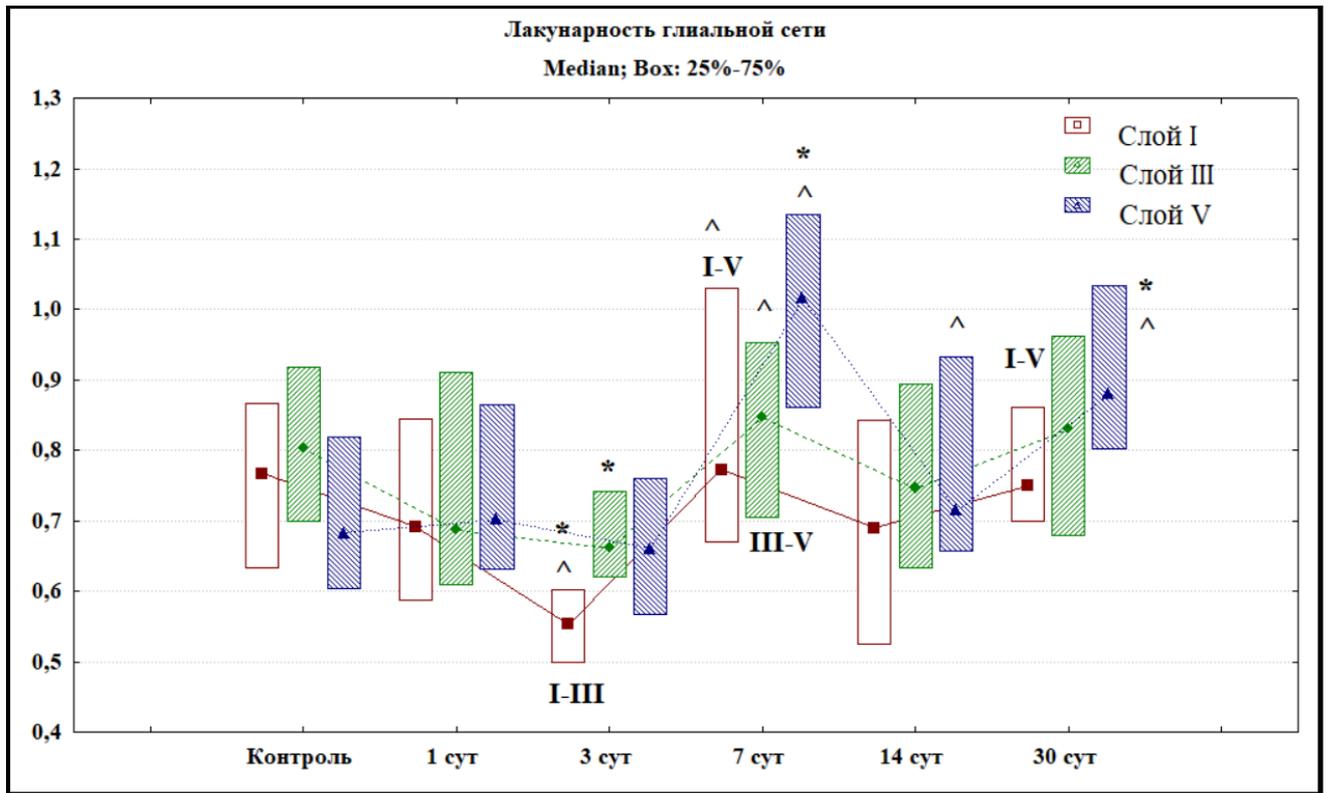
Рисунок 52 – Слой III СМК (А, Б, В) и слой V СМК (Г, Д, Е) через 3 (А, Г), 7 (Б, Д) и 30 (В, Е) сут после ПОСА. Разная степень гипертрофии отростков астроцитов. Стрелки – указанные проявления. Окраска: Окраска: GFAP.

Объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм



Примечание: * – различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$), I-III, I-V, III-V – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test; $p < 0,05$). При множественном сравнении по срокам (ANOVA Kraskel – Wallis) удалось отвергнуть нулевую гипотезу – слой I СМК ($df = 5$; $N = 22,8$; $p = 0,0004$); слой III СМК ($df = 5$; $N = 44,6$; $p = 0,0001$); слой V СМК ($df = 5$; $N = 31,8$; $p = 0,0001$).

Рисунок 53 – Фрактальная размерность глияльной сети различных слоев СМК в контроле и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3)



Примечание: * – различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$), ^{I-III}, ^{I-V}, ^{III-V} – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test; $< 0,05$). При множественном сравнении по срокам (ANOVA Kraskel – Wallis) удалось отвергнуть нулевую гипотезу - слой I СМК ($df = 5$; $N = 23,6$; $p = 0,0003$); слой III СМК ($df = 5$; $N = 12,8$; $p = 0,02$); слой V СМК ($df = 5$; $N = 37,2$; $p = 0,0001$).

Рисунок 54 – Лакунарность глияльной сети различных слоев СМК в контроле и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3)

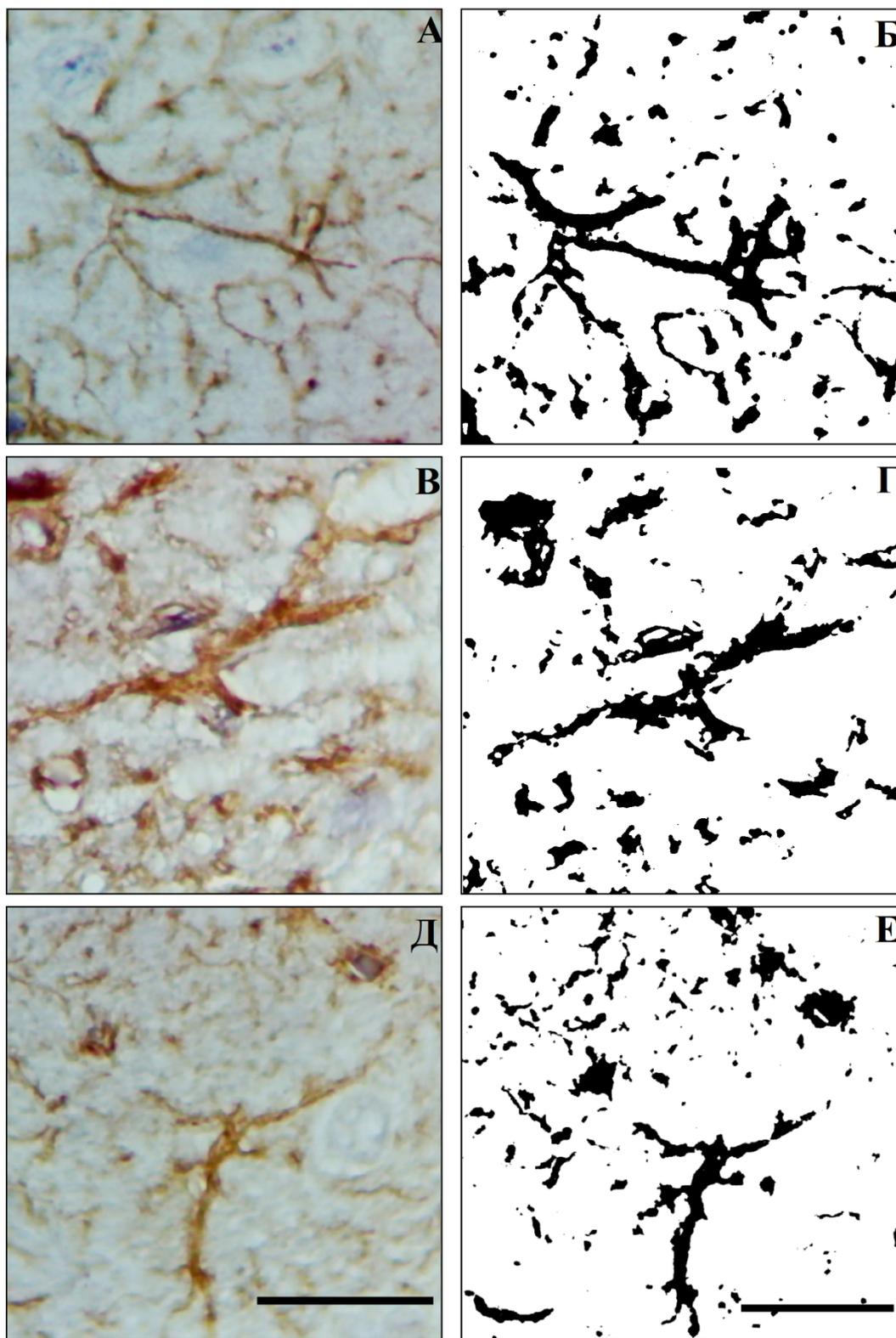


Рисунок 55 – Волокнистые астроциты слоя III СМК в контроле (А, Б) и через 3 (В, Г) и 30 (Д, Е) сут после ПОСА: А, В, Д – оригинальные изображения, Б, Г, Е – маски изображений. $FD (Г) = 1,50$, $\Lambda (Г) = 0,83$; $FD (Г) = 1,56$, $\Lambda (Г) = 0,64$; $FD (Е) = 1,50$, $\Lambda (Е) = 0,83$. Объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм

Через 14 и 30 сут после ПОСА происходит статистически значимое увеличение фрактальной размерности и снижение лакуарности астроглиальной сети во всех исследуемых слоях СМК. Происходило постепенное заполнение фрактального пространства отростками астроцитов (Рисунок 55).

Таким образом, при проведении фрактального анализа получена дополнительная количественная характеристика астроцитов, включающая площадь и форму распределения отростков астроцитов в пространстве. Согласно полученным результатам установлено, что пространственная реорганизация астроцитов, активация микроглиоцитов и олигодендроцитов способствовали выживанию нейронов в условиях ишемии.

При изучении нейронов, межнейронных контактов и глиальных клеток СМК после ПОСА выявлена синхронная реорганизация структурных компонентов нервной ткани СМК в ответ на ишемическое повреждение. В остром периоде (через 1 и 3 сут после ПОСА) ишемии деструктивные изменения нейронов (гиперхромия цитоплазмы и ядра, сморщивание перикариона, тигролиз) приводили к активации микроглиальных клеток и увеличению их численной плотности, гиперплазии и гипертрофии отростков астроцитов (увеличение фрактальной размерности отростков астроцитов и уменьшение лакуарности), происходило накопление GFAP в астроцитах. Уже через 1 сут появлялся перипеллюлярный отек нейронов, происходящий в результате отека-набухания астроцитов – активация дренажно-детоксикационной системы. На фоне уменьшения общей численной плотности нейронов и увеличения численной плотности деструктивно-измененных нейронов происходило статистически значимое (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$) уменьшение общей плотности терминалей. Вероятно, в остром периоде ишемии терминали подвергались деструктивным процессам, что влекло за собой уменьшение их количества. Сложным периодом для восстановления нервной ткани явились 7 сут после ПОСА. С одной стороны, происходила активация олигодендроцитов, с другой в астроцитах преобладали деструктивные процессы (фрактальная размерность уменьшалась по сравнению с предыдущим сроком, лакуарность достигала

максимальных значений за весь период наблюдения) снижение относительной площади GFAP-позитивного материала, что свидетельствует о деструкции астроцитов с разрушением их цитоскелета. Количество терминалей оставалось статистически значимо ниже контрольных значений, однако, в слое I и V СМК происходило адаптивное формирование крупных терминалей, в сравнении с контролем. В отдаленном периоде (через 14 и 30 сут после ПОСА) отмечены компенсаторно-восстановительные процессы нервной ткани: умеренные проявления астроглиоза, увеличение фрактальной размерности, в сравнении с предыдущим сроком, уменьшение лакуарности, увеличение относительной площади p38-позитивных терминалей во всех исследуемых слоях СМК, – что свидетельствует о том, что часть дегенеративно измененных нейронов носила обратимый характер. Установлен гетерохронный и гетероморфный характер изменений в разных слоях СМК после ПОСА. Так, больше всего деструктивным изменениям был подвержен слой III СМК. Вероятно, это связано с тем, что этот слой является вторичным проекционно-ассоциативным нейронным комплексом, пирамидные нейроны данного слоя являются ассоциативными и передают импульс по кортико-кортикальным путям.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нервной ткани главенствующая роль отводится нейронам, как высокодифференцированным клеткам, функции которых заключаются в регуляции всех систем организма [27]. В связи с этим, при повреждении головного мозга акцент поставлен на морфологическое изучение нейронов в условиях повреждения, детализацию патофизиологических процессов, протекающих в нейронах и их способности к восстановлению с целью усовершенствования диагностики и разработки терапевтических стратегий при повреждении головного мозга, в т. ч. ишемическом [5, 6, 28, 176].

Однако, важным компонентом ЦНС являются и глиальные клетки [201], которые обеспечивают структурную и питательную поддержку нейронов и участвуют в развитии ЦНС в нормальных физиологических условиях. Они также играют решающее значение в нейропатогенезе [182, 200]. Глиальные клетки могут образовывать и интегрировать сигналы поврежденных нейронов, высвобождать цитокины, привлекать иммунные клетки к месту ишемического повреждения, взаимодействовать и влиять на состояние других иммунных клеток. В связи с этим, перспективным направлением в нейроморфологии является изучение закономерностей синхронных проявлений реорганизации нейронов, глиальных клеток и микрососудистого русла головного мозга в компенсаторно-восстановительных процессах в условиях ишемического повреждения нервной ткани. Комплексное и одновременное изучение нейронов, глиальных клеток и микроциркуляторного русла позволит в полной мере рассмотреть процессы, протекающие в нервной ткани при ее повреждении, детализировать патофизиологические процессы при ишемии головного мозга и разработать способы коррекции для восстановления поврежденных нейронов [189].

Для изучения реакции нервной ткани в ответ на хроническую гипоперфузию головного мозга в эксперименте использовали общепринятую модель необратимой двусторонней перевязки общей сонной артерии [45, 117, 118,

228]. Выбор экспериментальной модели объясняется особенностями кровоснабжения головного мозга крыс и схожими чертами виллизиева круга крысы с артериальным кругом человека [52, 76, 87]. Изменения в головном мозге крысы в результате необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий носят диффузно-мелкоочаговый характер [35, 49, 80], происходит резкое снижение кровотока в головном мозге крысы (до 90 %) по общим сонным артериям, но полной остановки кровообращения не происходит, т. к. у 75 % крыс виллизиев круг замкнут и кровоток сохраняется по базилярной артерии [7, 76]. Используемая нами экспериментальная модель подходит для моделирования хронической гипоперфузии головного мозга и приводит к снижению регионарного мозгового кровотока в неокортексе до 50 % через 1–3 сут после необратимой двусторонней ПОСА с последующим восстановлением через 4 недели [126, 156, 194]. Данное состояние характерно для таких нозологий, как сосудистая деменция, ишемические состояния, связанные со старением и др. [99, 118, 151]. Эта проблема имеет высокую медико-социальную значимость, в связи с чем определена необходимость в изучении механизмов повреждения нейронов при ишемии/гипоксии и структурно-функционального восстановления неокортекса с целью разработки новых терапевтических стратегий.

В ответ на церебральную ишемию нейроны, глиальные клетки и структуры межклеточных контактов реагируют одновременно. Однако, реакция одних и тех же структур может отличаться в зависимости от степени и времени воздействия повреждающего фактора [35, 49, 80, 189]. Известно, что существует несколько фенотипов активированных глиальных клеток, эффекты которых могут носить повреждающий или нейропротекторный характер в зависимости от характеристик повреждения нервной ткани [29, 106, 111, 208]. Кроме того, глиальные клетки воздействуют не только на нейроны, но и контактируют между собой и могут приводить к активации друг друга, способствуя функциональному восстановлению нервной ткани [82, 89, 114, 170]. В связи с этим активно изучается одновременная реакция нейронов, глиальных клеток и структур

межклеточного взаимодействия на церебральную ишемию в эксперименте [133, 189, 213].

Таким образом, исход ишемического повреждения нервной ткани зависит не только от нейронов, но и от реакции глиальных клеток. Они играют важную роль в адаптации нейронов к условиям ишемии и обеспечивают нейропротекцию после ишемии. Поэтому в аспекте изучения единства всех клеточных систем СМК целесообразно изучать полученные нами результаты. Особую роль мы отводим нейроглиальным взаимоотношениям.

Установлено, что морфологические характеристики нейронов слоя III и слоя V СМК, а также количественные параметры нейроцито-, глиоцито-, синаптоархитектоники и нейроглиального соотношения в контрольной группе и после необратимой двусторонней ПОСА статистически значимо отличались. В связи с этим верно предположить наличие влияния фактора ПОСА на реакцию нервной ткани.

В результате критического снижения мозгового кровотока после необратимой двусторонней ПОСА (до 50 % через 1 и 3 сут) [126, 156, 194] в первую очередь происходит повреждение митохондрий => энергетический дефицит => активация анаэробного гликолиза => нарушение работы протонных помп => накопление Ca^{2+} в клетке => активация Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз и протеаз => разрушение мембран. Эти изменения приводят к необратимым последствиям для клетки и гибели путем некроза или апоптоза [23, 32].

Согласно нашим и литературным данным, в ответ на ишемическое повреждение нервной ткани происходит изменение способности структур нейрона связываться с красителем, что проявляется изменением интенсивности окрашивания цитоплазмы и ядра в сторону, как усиления, так и ослабления интенсивности окраски [10, 28, 75]. Однако, идентифицировать изменения в нейроне, как обратимые или необратимые, только по степени окрашивания не представляется возможным. Для получения полноты картины морфо-функциональной реорганизации нейронов, глиальных клеток и синаптических терминалей требуется комплексный подход в изучении нервной

ткани головного мозга. В настоящее время дополнением к классическим методам морфометрического исследования являются иммуногистохимические методы, которые направлены на выявление синтезируемых маркерных белков. К распространенным нейромаркерам относятся: NSE (нейрон-специфическая енолаза), GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок астроцитов), IBA1 (кальций-связывающий белок, специфичный для микроглии), p38 (синаптофизин) [145]. Нейрон-специфическая енолаза является высокоспецифичным нейромаркером. Енолаза катализирует дегидратацию 2-фосфо-D-глицерата (PGA) до фосфоенолпирувата (PEP) в гликолитическом пути. Этот фермент необходим для анаэробного превращения глюкозы в метаболиты, пригодные для окисления. NSE в нейронах располагается в перикарионах и отростках и обнаруживается в нормальных условиях [34]. Интенсивность экспрессии этого фермента говорит о разной метаболической активности, увеличение содержания NSE в нейронах наблюдалось при ишемическом повреждении головного мозга. Судить о функциональной активности представляется возможным по интенсивности окрашивания NSE-позитивного материала [8]. В изучении синаптоархитектоники основную роль занимает исследование белка синаптофизина (p38), являющегося белком мембран синаптических пузырьков нейронов и принимающего участие в регуляции и осуществлении синаптической передачи [145]. Согласно литературным данным, основным способом точного количественного анализа терминалей является электронная микроскопия (ЭМ) [58, 109]. Однако методы ЭМ для морфометрии синапсов на больших объемах материала являются дорогостоящими, трудоемкими и технически сложными [105, 158, 160, 79, 184]. Поэтому наиболее приемлемым вариантом рутинного количественного изучения изменений синаптических популяций, как на животных, так и на людях, является использование различных методов измерения синаптофизин-иммунореактивных терминалей (количество, площадь, интенсивность окраски, форма). С помощью иммуногистохимического типирования p38 была выявлена реакция синапсов на окклюзию общих сонных артерий [37, 71]. Аналогичных работ при моделировании ПОСА не проводилось. Таким образом, иммуногистохимическая

стереология является наиболее полезным методом оценки количества синапсов в больших объемах материала. Однако анализ литературы показал, что целесообразно провести дополнительное исследование и сопоставить результаты иммуногистохимического и ультраструктурного изучения реакции аксональных терминалей сенсомоторной коры белых крыс на ПОСА для более полной характеристики количественных изменений. IBA1 – кальций связывающий белок, экспрессируется в микроглии и повышается в активированной микроглии [141]. Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) является основным белком промежуточных филаментов в зрелых астроцитах, а также важным компонентом цитоскелета астроцитов во время развития. GFAP участвует в функциях астроцитов, которые важны во время регенерации, синаптической пластичности и реактивного глиоза [181]. Астроциты имеют сложную древовидную повторяющуюся организацию и являются сложными фрактальными структурами [204], а их морфология влияет не только на пространственные отношения с нейронами, но и с ОДЦ, сосудистыми клетками и другими астроцитами [193]. Установлено наличие прямой зависимости между степенью и характером морфологических изменений нейронов и астроцитов [29], а функция астроцитов при повреждении головного мозга определяется степенью повреждения нейронов [53]. Для получения дополнительной информации о пространственной организации отростков астроцитов, а также установления морфологических особенностей реорганизации астроцитов при церебральной ишемии применяется фрактальный анализ [61, 62, 204]. В ходе фрактального анализа рассчитываются фрактальная размерность – показатель заполнения нервной ткани (фрактального пространства) астроцитами (фрактальные структуры) и лакунарности – показатель неоднородности распределения фрактальных структур. Фрактальный анализ может быть использован для выявления различий в механизмах при различных патологиях головного мозга. Ранее этот метод был использован для изучения структурно-функциональных изменений астроцитов при разных видах инсульта и болезни Альцгеймера [204].

В связи с вышеизложенным, в нашем исследовании мы использовали комплексный подход для исследования реакции нервной ткани СМК головного мозга крыс на церебральную ишемию после необратимой двусторонней ПОСА. Комплексный подход включал в себя исследование препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином, тионином по методу Ниссля (подсчет нейронов и общая оценка состояния нейронов и глиальных клеток), иммуногистохимические методы исследования для идентификации и оценки морфофункционального состояния всех типов нейронов, глиальных клеток и синаптических терминалей, а также фрактальный анализ для изучения пространственной реорганизации отростков астроцитов. Тем самым, представляется возможным одновременно исследовать все структуры нервной ткани, что позволяет получить полную картину морфо-функциональных изменений нейронов, глиальных клеток и структур межклеточных контактов в ответ на ишемическое повреждение головного мозга.

По нашим и литературным данным, изменение интенсивности окрашивания в сторону уменьшения (гипохромные нейроны) или усиления (гиперхромные нейроны) без нарушения конфигурации тела могут быть рассмотрены, как нейроны с разным уровнем их функциональной активности [12] и свидетельствовать о внутриклеточной регенерации. Так, гиперхромный несморщенный нейрон имеет запас энергии и находится в периоде активного функционирования, в то время, как гипохромный нейрон находится в состоянии относительного покоя, в это время происходит регенерация структур нейрона накопление энергии [64]. По нашим данным, уже через 1 сут после ПОСА в слое III и слое V СМК происходило статистически значимое (Mann – Whitney U-test $p < 0,05$) увеличение ЧП гиперхромных несморщенных нейронов, в сравнении с контролем, отмечен пик увеличения за весь период наблюдения (см. Рисунок 28). Через 3, 7 и 14 сут после ПОСА происходило статистически значимое снижение (Mann – Whitney U-test $p < 0,05$) ЧП гиперхромных несморщенных нейронов в слое III и слое V СМК, в сравнении с 1 сут. В тоже время в слое III и слое V СМК отмечено статистически значимое (Mann – Whitney U-test $p < 0,05$) увеличение ЧП

гипохромных нейронов через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ПОСА, в сравнении с контролем, пик увеличения ЧП гипохромных нейронов наблюдался через 30 сут после ПОСА (см. Рисунок 29). Вероятно, часть гиперхромных несморщенных нейронов переходила из состояния активного функционирования в состояние относительного покоя для накопления энергии с целью регенерации в условиях ишемии, что имеет отражение в изменении степени интенсивности окрашивания. Согласно данным литературы [20, 29, 77, 168], судить о функциональной активности нейронов представляется возможным, используя иммуногистохимический метод для выявления NSE. Так, отдельные нейроны демонстрировали более яркую реакцию на NSE, что свидетельствует о более интенсивной экспрессии NSE в нервных клетках. По данным С. П. Сергеевой и соавторов [20], при исследовании головного мозга после ишемического инсульта в 3-х зонах головного мозга: 1-я – непосредственно прилежащая к очагу, 2-я – отдаленная на 5–10 см от предыдущей, 3-я – симметричная очагу область в коллатеральном полушарии, более интенсивная реакция на NSE получена во 2-й и 3-й зонах, что свидетельствует о компенсаторном увеличении содержания NSE в нейронах и реализации пластических процессов в сохранившихся нейронах. По нашим данным, наиболее яркая реакция на NSE отмечена через 1 и 3 сут после ПОСА (см. Рисунок 33), доля (%) NSE-позитивных нейронов в слоях III и V СМК мозга крыс достигала максимальных значений через 1 сут после ПОСА. В слое III СМК через 3–14 сут после ПОСА отмечалось статистически значимое прогрессивное снижение доли NSE-позитивных нейронов в сравнении с контролем, достигая пика снижения через 14 сут, через 30 сут – увеличение, в сравнении с 14 сут (см. Рисунок 34). В слое V СМК через 3–30 сут после ПОСА отмечалось статистически значимое снижение количества NSE-позитивных нейронов с достижением минимальных значений через 30 сут после перевязки общих сонных артерий (см. Рисунок 34). Повышение доли NSE-позитивных нейронов в слоях III и V СМК свидетельствует о высокой функциональной активности на протяжении 30 сут после ПОСА, однако, активность имеет гетерохронный характер и не одинакова в разных слоях СМК. Полученные

данные свидетельствуют о разности метаболической активности и адаптационных резервов нейронов в разных слоях СМК.

В связи с разной метаболической активностью нейронов, часть нервных клеток более чувствительная к гипоксии и деструктивные изменения приобретают необратимый характер, т. к. ишемическое изменение нейрона представляет собой коагуляционный некроз. Сначала происходит тигролиз, как свидетельство исчезновения РНК в результате денатурации и коагуляции белка в цитоплазме нейрона. За тигролизом следует уменьшение перикариона в размере за счет уменьшения цитоплазмы и ядра, клетка приобретает треугольную или веретенную форму. На месте телец Ниссля после тигролиза отмечается вакуолизация. Сначала вакуоли располагаются по периферии клетки, затем могут сливаться и увеличиваться в размере. Уменьшение цитоплазмы и ядра в объеме приводит к увеличению плотности расположения в них органелл и, как следствие, гиперхроматозу. Повреждение мембран, активация гидролаз приводят к потере ядром воды, конденсации хроматина, кариопикнозу и кариорексису и кариолизису. Такие клетки имеют гомогенный вид, контуры ядра стерты или отсутствуют – клетки-тени [10, 22, 63]. По литературным данным, при исследовании препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином, вследствие связывания эозина с денатурированным белком в цитоплазме нейрона и утратой базофилии (тигролиз) возможна эозинофилия цитоплазмы, которая в литературе описывается, как «острая эозинофильная дегенерация нейронов» [73, 75]. По данным В. В. Криштоп и соавторов [40], полученным при исследовании моторной коры мозга крыс после необратимой двусторонней ПОСА, на 1-е, 6-е и 8-е сут после ПОСА значительно нарастала ЧП нейронов с необратимыми изменениями, достигая максимальных значений на 8-е сут после ПОСА. Затем отмечено снижение СП необратимо измененных нейронов со стабилизацией показателя на 21-е сут после ПОСА. Полученные результаты свидетельствуют о преобладании деструктивных процессов в период с 1-х по 8-е сут после ПОСА, стабилизация, связанная со снижением функциональной активности нейронов и развитием внутриклеточного отека – 2-я и 3-я недели после ПОСА, 4-я и 5-я недели –

развитие неполной адаптации в виде приближения нейронов к сосудам гемоциркуляторного русла, увеличение количества сателлитных глиоцитов и погружением их в цитоплазму нейронов. По нашим данным, в слое V СМК численная плотность необратимо измененных нейронов увеличивалась через 1, 3, 7 и 14 сут после ПОСА, в сравнении с контролем, а через 30 сут уменьшалась, в сравнении с 14 сут (см. Рисунки 28 и 31). В слое III СМК численная плотность нарастала на протяжении всех 30 сут после ПОСА, в сравнении с контролем (см. Рисунки 28 и 31). Увеличение ЧП необратимо измененных нейронов происходило одновременно со статистически значимым (Mann – Whitney U-test $p < 0,05$) снижением общей численной плотности нейронов в слое III и V СМК на всем протяжении исследуемого периода (30 сут) (см. Рисунок 26). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что нейроны слоя III СМК были более подвержены деструкции, чем нейроны слоя V СМК, полное стабильное восстановление нейронов в слое III СМК после ПОСА не происходило или требовало значительно большего времени. В слое V СМК отдаленный период ишемии (14 и 30 сут) характеризовался уменьшением ЧП необратимо измененных нейронов и снижением функциональной активности, что отражено снижением доли NSE-позитивных нейронов (см. Рисунок 34). Вероятно, это повлияло на развитие компенсаторно-приспособительных процессов в слое V СМК.

На фоне активации и преобладания деструктивных изменений нейронов, глиальных клеток и синаптических терминалей происходит активация и пролиферация микроглиальных клеток, т. к. они чувствительны к ишемическому воздействию и немедленно реагируют [163]. Активированные микроглиальные клетки приобретали амебоидную форму, теряли отростки (см. Рисунок 47), что необходимо для перемещения микроглии в зону повреждения [46, 141]. В сравнении с контролем, через 1 сут численная плотность микроглиоцитов на 1 мм^2 поля зрения СМК достигала максимальных значений, в слое III отмечалось увеличение на 16,7 %, в слое V на 14,3 %. При иммуногистохимическом исследовании были обнаружены активированные микроглиоциты в слоях III и V СМК через 1 и 3 сут после ПОСА, появлялась сателлитарная микроглия

(см. Рисунок 47). Таким образом, происходит защита неповрежденных нейронов и элиминация деструктивно измененных и погибших нейронов путем фагоцитоза. Происходит подготовка нервной ткани для дальнейшего восстановления другими глиальными клетками. Аналогичные данные были получены другими авторами при исследовании СМК после 40-мин ООСА [17] и после необратимой двусторонней ПОСА [39].

Нами установлена динамичность изменений численной плотности глиальных клеток на всем протяжении исследуемого периода после необратимой двусторонней ПОСА. Пролиферативная активность разных типов глиальных клеток отмечалась в разные сроки ишемии. Пролиферация МГЦ в слоях III и V СМК отмечена через 1 и 3 сут с начала ишемии, увеличение численной плотности олигодендроцитов происходило через 7 сут после ПОСА, пролиферативная активность Ас отмечена через 14 сут после ПОСА в слоях III и V СМК (см. Рисунок 30). Начиная с 1-х сут после ПОСА, отмечается гипертрофия ножек астроцитов на GFAP-позитивном материале. По литературным данным, гипертрофия является следствием набухания астроцитов в результате нарушения ионного гомеостаза и энергетического баланса после ПОСА. В ответ на ишемическое повреждение астроциты пытаются стабилизировать баланс веществ и жидкости в межклеточном пространстве [34]. Аналогичные данные были получены другими авторами при исследовании СМК после окклюзии общих сонных артерий [17]. Реакция макроглии была незначительна через 3 сут после ПОСА. В подострый период ишемии (7 и 14 сут) отмечался рост численной плотности астроцитов и олигодендроцитов в слоях III и V СМК. Пик увеличения численной плотности олигодендроцитов приходился на 7-е сут, астроцитов – на 14-е сут. Это отмечалось и в других исследованиях [17, 39]. Максимальных значений численная плотность макроглиоцитов достигала на фоне роста необратимо измененных нейронов, что может быть рассмотрено, как активация процесса адаптации нервной ткани в ответ на ишемическое повреждение.

Таким образом, нами выявлена активация всех глиальных клеток, как составляющих единой интегрированной санирующей клеточной системы

головного мозга. Вероятно, это необходимо для защиты и восстановления нервной ткани в результате ишемического повреждения после необратимой двусторонней ПОСА и может способствовать активизации неповрежденных нейронов и функциональному замещению погибших нейронов [30, 33, 35].

В настоящее время большое внимание уделяется изучению нейро-глио-сосудистым микроструктурным комплексам, которые являются сложными структурно-функциональными системами, включающими нейроны, глиальные клетки (фибрилярные и протоплазматические астроциты), перициты и эндотелиоциты [13, 41, 89, 189]. Нейро-глио-сосудистые микроструктурные комплексы мы изучали с помощью световой микроскопии и иммуногистохимии (NSE, GFAP). Особое значение имеют данные численной плотности клеточного состава нейро-глио-сосудистых комплексов СМК. Нейроглиальный индекс увеличивался на протяжении 14 сут после необратимой двусторонней ПОСА и достигал на этом сроке максимальных значений (увеличение на 25 %).

В результате увеличения ЧП деструктивно измененных нейронов, а также гибели нервных клеток, происходят изменения в системе межнейронных коммуникаций. Имеются исследования реакции нервной ткани на острую ишемию головного мозга, согласно которым в гиппокампе через 1 сут после 20-минутной ООСА происходило значимое снижение ЧП межнейронных контактов и площади срезов р38-позитивного материала в СА₃ гиппокампа, а затем (3–14 сут) восстановление общего количества синапсов и площади срезов р38-позитивного материала. Это свидетельствовало о структурно-функциональной сохранности всех компонентов системы коммуникации значительной части пирамидных нейронов при острой ишемии, целенаправленная активация естественных механизмов защиты нервной ткани головного мозга позволит уменьшить степень необратимых процессов после острой ишемии [37]. По нашим данным, после ПОСА в СМК крыс на фоне сохранения значительной части пирамидных нейронов и компенсаторной реорганизации нейроглиальных взаимоотношений были выявлены закономерные изменения структур межнейронной коммуникации, в частности – численной плотности и

относительной площади срезов терминалей нейропиля. Через 1 сут после ПОСА во всех исследуемых слоях СМК ЧП статистически значимо уменьшалась. В слое I СМК – на 28,6 %, в слое III СМК – на 46,9 %, в слое V СМК – на 46,4 % и сохранялась примерно на этом уровне в течение всего наблюдения (см. Рисунок 41). В этот период происходила деструкция синаптических терминалей, повлекшая за собой снижение их ЧП. Однако, относительная площадь р38-позитивного материала имеет гетерохронный характер и отличительные особенности в разных слоях СМК. Так, в острый период ишемии (через 1 и 3 сут после ПОСА) в слое I и слое III СМК отмечается статистически значимое снижение через 1 сут на 10,9 % – слой I и 35 % – слой III СМК, через 3 сут на 28,1 % – слой I СМК и 50 % – слой III СМК. В слое I через 7, 14 и 30 сут отмечен рост относительной площади р38-позитивного материала, в сравнении с контролем, в слое III СМК увеличение наблюдается через 30 сут после ПОСА. Данные изменения свидетельствуют о деструкции синаптических терминалей в этих слоях в остром периоде ишемии, в слое I компенсаторно-восстановительные процессы наблюдались через 7, 14 и 30 сут, в слое III лишь в отдаленном периоде (через 30 сут). В слое V СМК на протяжении всех 30 сут исследования отмечен статистически значимый рост относительной площади р38-позитивного материала. Таким образом, в слое V СМК происходило компенсаторное увеличение синаптических терминалей в объеме для реализации пластических процессов нервной ткани с первых суток ишемического повреждения. В большей степени деструктивные изменения претерпевали терминали слоя III СМК.

Полученные в работе данные послужат для уточнения особенностей структурно-функциональной реорганизации аксональных терминалей разных слоев СМК после ПОСА. Выявленные различия могут быть связаны с особенностями нейро-глиальных отношений изученных слоев СМК – атрофией и гипертрофией астроцитов по типу обратимого реактивного глиоза [128, 150, 159].

Известно, что стандартным ответом нервной ткани головного мозга на любое травматическое воздействие, в т. ч. ишемическое является отек-набухание [83, 116]. Согласно данным И. П. Кошман и соавторов [51], после тяжелой ЧМТ в

СМК очаги отека-набухания через 1 и 3 сут охватывали до 30 % СМК, достигая в эти сроки максимальных значений. При острой неполной ишемии после разной по продолжительности (20-, 30- и 40-мин) ООСА через 1 и 3 сут отмечены проявления «пористого» нейропиля в молекулярном слое, в слоях III и V СМК появлялись нейроны с перичеселлюлярным отеком [60]. Подобные результаты получены Бонь Е. И. [10], перичеселлюлярный отек нейронов теменной коры появлялся через 1 сут после необратимой двусторонней ПОСА. В нашем исследовании получены данные о гидропических изменениях нейропиля, согласующиеся с вышеизложенными данными литературы. По нашим данным, гидропические изменения преобладали в нейропиле (отростки астроцитов, терминали, дендриты), однако, встречались и нейроны с признаками вакуолизации цитоплазмы. Относительная площадь зон отека-набухания, по нашим данным, во всех исследуемых слоях СМК через 1 и 3 сут после ПОСА увеличивалась, достигала своего пика и статистически значимо (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$) отличалась от контрольных значений (см. Рисунок 46). Затем происходило снижение, в слое I СМК относительная площадь зон отека-набухания стабилизировалась через 14 и 30 сут после ПОСА, в слоях III и V СМК восстановление до контрольных цифр не происходило, однако, через 7, 14 и 30 сут отмечено значимое снижение относительной площади зон отека-набухания, в сравнении с 1 и 3 сут (см. Рисунок 46).

В ответ на повреждение головного мозга одной из первых глиальных клеток реагирует астроцит. Набухание астроцитов является одним из первых ответов на церебральную аноксию-ишемию [122, 203], этот процесс начинается вначале в отростках астроцитов вокруг кровеносных сосудов, а затем перемещается в сторону тела клетки [203]. В ответ на повреждение головного мозга и нейродегенерацию астроциты претерпевают ряд морфологических и функциональных изменений, которые в целом описываются как астроглиоз. Эта реакция в основном характеризуется набуханием тела клетки, наличием более крупных и толстых отростков с увеличением экспрессии GFAP, ядро становится более рельефным и обычно смещается к периферии [192]. В исследованиях

морфологических изменений ответ астроглии на повреждение обычно просто описывается как фокальный/диффузный глиоз. Классические методы количественной оценки, такие как площади, диаметры и периметры, не дали значимых результатов в объективной классификации астроглиоза и тем более не смогли выявить различий между разными патологиями [192]. Известно, что при церебральной ишемии в остром периоде (через 1 и 3 сут) происходит отек тела и отростков астроцитов, их гипертрофия и гиперплазия, а также усиление экспрессии GFAP [86, 205]. По результатам исследования Д. Б. Авдеева и соавторов [61, 62], после 20 мин ООСА в гиппокампе и неокортексе через 1 сут происходило разрушение значительной части отростков астроцитов, через 3 и 7 сут после ООСА отмечалось восстановление с увеличением степени ветвления и заполнения фрактального пространства. Данные изменения авторы относят к адаптационно-репаративным и относят эти изменения к механизмам естественной защиты нервной ткани головного мозга в реперфузионном периоде. По данным Wagner D. C. [224], через 4 дня после ОСМА происходило усиление пространственной организации отростков астроцитов. По результатам Hai Long L. [167], при ишемии головного мозга, вызванной фототромбозом, через 2 сут происходило значительное повышение GFAP в сравнении с контролем. Эти изменения необходимы для восстановления нейронов и проявлялись при разных экспериментальных моделях церебральной ишемии. Наши данные согласуются с данными литературы, через 1 и 3 сут после ПОСА отмечена гипертрофия отростков астроцитов слоя III и V СМК (см. Рисунок 52), а также увеличение относительной площади GFAP-позитивного материала (см. Рисунок 51). Реорганизация пространственной организации отростков астроцитов проявляется изменением показателей фрактальной размерности и лакунарности. По нашим данным происходило увеличение фрактальной размерности отростков астроцитов выше контрольных значений, достигая пика увеличения во всех исследуемых слоях СМК через 3 сут после ПОСА, увеличиваясь на 7,3 % – слой I СМК, 5,3 % – слой III СМК, 4,6 % – слой V СМК от контрольных значений (см. Рисунок 53). А через 3 сут после ПОСА достигала минимальных значений и уменьшалась на

28,5 % – слой I СМК, 17,5 % – слой III СМК, 2,9 % – слой V СМК от контрольных значений (Рисунок 54). Седьмые сутки после ПОСА являлись самыми тяжелыми, лакунарность во всех слоях СМК достигала максимальных значений, а фрактальная размерность претерпевала снижение в слоях I, III и V СМК (см. Рисунки 53 и 54). В этот период происходили деструктивные процессы в астроцитах. Через 14 и 30 сут происходило восстановление деструктивно-измененных отростков астроцитов с увеличением степени ветвления и заполнения фрактального пространства. Полученные нами данные свидетельствуют о гетерогенности изменений фрактальной размерности и лакунарности астроцитов при разной степени поражения нервной ткани. Таким образом, при изучении реакции астроцитов выявлены признаки гипертрофии отростков, увеличение экспрессии GFAP – умеренный астроглиоз. Отмечены признаки адаптивных и реактивных изменений отростков астроцитов, что может быть рассмотрено, как активация естественных защитных функций астроглии, которые направлены на восстановление и утилизацию деструктивно измененных нейронов.

Таким образом, перспективным направлением в исследовании механизмов компенсаторно-восстановительных процессов нервной ткани при ишемическом повреждении является изучение нейроглии. Воздействие на глиальные клетки и регуляция нейропротекторных фенотипов глии позволит максимально ограничить неповрежденные нейроны и восстановить измененные нейроны, тем самым, способствуя восстановлению нервной ткани. В этой связи наше исследование поможет детализировать механизмы морфометрических изменений в СМК при тяжелой ишемии.

ВЫВОДЫ

1. Нейроны, глиальные клетки и синаптические терминалы, а также нейроглиальные отношения в сенсомоторной коре головного мозга белых крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после перевязки общих сонных артерий статистически значимо различались.

2. Через 1 и 3 суток после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий нарастали процессы деструкции и гибели нейронов. Отмечена активация микроглиальных клеток с целью саногенетической очистки нервной ткани.

3. Изменение численной плотности глиальных клеток имеет динамический характер. Первыми в условиях гипоксии-ишемии после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий реагируют микроглиальные клетки (1 и 3 суток), затем через 7 суток активируются олигодендроциты и через 14 суток – астроциты.

4. В слое III и V СМК через 1, 3 и 7 суток деструкция синаптических терминалов была связана с их гипергидратационными изменениями. Установлено наличие отрицательных корреляционных связей ($R > 0,70$) между площадью синаптофизина (p38) и выраженностью отека-набухания.

5. Фрактальный анализ иммуногистохимических препаратов (GFAP) показал через 3 суток после перевязки общих сонных артерий очаговую деструкцию отростков астроцитов, в отдаленном периоде (через 14 и 30 суток после ПОСА) происходило восстановление пространственной организации отростков астроцитов, которое имело компенсаторно-восстановительный характер.

6. Подострый период (14–30 суток) сопровождался восстановительной реорганизацией нейронов (гипертрофия) и глиальных клеток, а также усложнением межнейронных взаимоотношений. Усиливалась экспрессия GFAP и увеличивалось количество клеток-сателлитов.

7. Восстановление межнейронных коммуникаций после перевязки общих сонных артерий сочеталось с уменьшением отека-набухания, снижением содержания темных нейронов, восстановлением цитоскелета нейронов, усилением

проявлений реактивного астроглиоза, усложнением организации и увеличением количества синаптических терминалей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ас	астроциты
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
МГЦ	микроглиоциты
НВЕ	нейроваскулярной единицы
НГИ	нейроглиальный индекс
ОДЦ	олигодендроциты
ООСА	окклюзия общих сонных артерий
ОЧПН	общая численная плотность нейронов
ПОСА	перевязка общих сонных артерий
СМК	сенсомоторная кора
ЧПНН	численная плотность нормохромных нейронов
ЧМТ	черепно-мозговая травма
ЦНС	центральная нервная система
GFAP	кислый фибриллярный белок астроцитов
FD (ФР)	фрактальная размерность
IBA1	кальций связывающий белок, специфичный для микроглии
Λ	лакунарность
NSE	нейрон специфическая енолаза
p38	синаптофизин
ROI	зона интереса, только нейропиль

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы изучения структурно-функционального состояния нейронов коры большого мозга человека в постишемическом периоде / А. В. Мыщик, С. С. Степанов, П. М. Ларионов, В. А. Акулинин // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2012. – Т. 1. – № 1. – С. 37–47.
2. 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.
3. Антоненко, Л. М. Когнитивные нарушения, головокружение и неустойчивость у пациентов с артериальной гипертензией / Л. М. Антоненко, Н. В. Вахнина, Д. О. Громова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2020. – Т. 12. – № 5. – С. 92–97.
4. Беритов И. С. Структура и функции коры большого мозга. – М : Изд-во Наука, 1969. – 531 с.
5. Бонь, Е. И. Динамика субтотальной церебральной ишемии – изменения морфологических характеристик нейронов филогенетически разных отделов коры головного мозга крыс / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович, Е. О. Бондарик // Актуальные проблемы медицины: сборник материалов итоговой научно-практической конференции, Гродно, 28–29 января 2021 года. – Гродно: Гродненский государственный медицинский университет, 2021. – С. 103–106.
6. Бонь, Е. И. Изменения нейронов теменной коры головного мозга крыс с его субтотальной и тотальной ишемией / Е. И. Бонь, Е. О. Бондарик, Н. Е. Максимович // Актуальные проблемы медицины: Сборник материалов итоговой научно-практической конференции, Гродно, 24 января 2020 года / Отв. редактор В. А. Снежицкий. – Гродно: Гродненский государственный медицинский университет, 2020. – С. 83–86.
7. Бонь, Е. И. Морфологические представления о кровообращении головного мозга крысы / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 17. – № 2. – С. 30–36.

8. Бонь, Е. И. Нейроглия и ее роль в патогенезе ишемического повреждения головного мозга. Иммуногистохимические маркеры нейроглии / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович, А. В. Малыгина // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2021. – Т. 20. – № 3. – С. 18–24.
9. Бонь, Е. И. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 59–71.
10. Бонь, Е. И. Сравнительный анализ морфологических нарушений нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при различных видах экспериментальной ишемии головного мозга / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович // Оренбургский медицинский вестник. – 2021. – Т. 9. – № 2 (34). – С. 29–37.
11. Боровиков, В. П. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере / В. П. Боровиков. – Санкт-Петербург: Питер, 2003. – 688 с.
12. Бродский В. Я. Трофика клетки / В. Я. Бродский. – Москва, 1966. – 355 с.
13. 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.
14. Васильева, В. А. Периоды микроструктурной перестройки сенсомоторной и задней ассоциативных областей коры большого мозга человека / В. А. Васильева, Н. С. Шумейко // Рос. морфол. вед. – 2001. – № 1/2. – С. 183–185.
15. Васильева, В. А. Структурные особенности нейронных группировок в различных полях зрительной коры большого мозга человека от рождения до 20 лет / В. А. Васильева // Прикладные аспекты морфогенеза и регенерации в онтогенезе и эксперименте. – Екатеринбург, 1996. – С. 13–16.
16. Ветровой, О. В. Церебральные механизмы гипоксического/ишемического посткондиционирования обзор / О. В. Ветровой, Е. А. Рыбникова, М. О. Самойлов // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – № 3. – С. 542–551.
17. Влияние окклюзии общих сонных артерий на двуядерные клеточные

образования сенсомоторной коры большого мозга крыс / Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин, С. С. Степанов [и др.] // *Общая реаниматология*. – 2021. – Т. 17. – № 2. – С. 55–71. – DOI 10.15360/1813-9779-2021-2-55-71.

18. Влияние раннего и позднего ишемического прекондиционирования головного мозга на выраженность повреждения нейронов гиппокампа и степень неврологического дефицита у крыс / Н. С. Щербак, Т. Ю. Выболдина, М. М. Галагудза [и др.] // *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. – 2012. – Т. 98. – № 8. – С. 990–999.

19. Гидропическая дистрофия сенсомоторной коры белых крыс в контексте формирования темных нейронов и изменения нейроглиальных взаимоотношений после краткосрочной окклюзии общих сонных артерий / А. В. Горбунова, С. С. Степанов, В. А. Акулинин [и др.] // *Journal of Siberian Medical Sciences*. – 2021. – № 3. – С. 66–81.

20. Головной мозг после ишемического инсульта: клинко-гистологическое исследование / С. П. Сергеева, А. А. Савин, Л. В. Шишкина, Е. В. Виноградов // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 2017. – Т. 117. – № 3-2. – С. 66–70.

21. Гомазков, О. А. Астроциты как компоненты регуляции высших функций мозга / О. А. Гомазков // *Нейрохимия*. – 2019. – Т. 36. – № 4. – С. 267–274.

22. Гулевская, Т. С. Патологическая анатомия нарушений мозгового кровообращения при атеросклерозе и артериальной гипертензии: руководство для врачей / Т. С. Гулевская, В. А. Моргунов; Т. С. Гулевская, В. А. Моргунов ; Науч. центр неврологии Российской акад. мед. наук. – Москва : Медицина, 2009. – 296 с.

23. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М. : Медицина, 2001. – 328 с.

24. Дамулин, И. В. Сенсомоторная интеграция в норме и после перенесенного инсульта / И. В. Дамулин // *Consilium Medicum*. – 2018. – Т. 20. – № 2. – С. 63–68. – DOI 10.26442/2075-1753_2018.2.63-68.

25. Данилова, Т. Г. Состояние нервной ткани и трофики головного мозга

у крыс при ишемии / Т. Г. Данилова, Г. В. Шумихина // Национальная Ассоциация Ученых. – 2015. – № 2-8 (7). – С. 34–36.

26. Ермохин, П. Н. Гистопатология центральной нервной системы / П. Н. Ермохин // Атлас микрофотографий. – М. : «Издательство «Медицина», 1969. 244 с.

27. Зиматкин, С. М. Строение и развитие коры головного мозга крысы / С. М. Зиматкин, Д. А. Маслакова, Е. И. Бонь. – Гродно: Гродненский государственный медицинский университет, 2019. – 156 с.

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

29. Изменения структуры нейронов и астроцитов серого вещества головного мозга при его острой локальной ишемии у человека / С. П. Сергеева, Л. В. Шишкина, П. Ф. Литвицкий [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т. 60. – № 4. – С. 4–8.

30. Изменения цитоархитектоники префронтальной коры мозга мужчин и женщин в зрелом и пожилом возрасте / И. Н. Боголепова, Л. И. Малофеева, П. А. Агапов, И. Г. Малофеева // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2017. – Т. 6. – № 3. – С. 13–18.

31. 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.

32. Исследование кинетических характеристик лактатдегидрогеназы мозга крыс при ишемии и реперфузии / Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, Р. Н. Джабраилова, Э. З. Эмирбеков // Нейрохимия. – 2014. – Т. 31. – № 4. – С. 307.

33. Ишунина, Т. А. Морфофункциональные изменения и компенсаторные механизмы в головном мозге человека при старении и болезни Альцгеймера / Т. А. Ишунина, И. Н. Боголепова, Д. Ф. Свааб // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2020. – Т. 9. – № 1. – С. 77–85.

34. 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.

35. 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. – Т. 103. – № 10. – С. 1135–1147.

36. Козловский, В. И. Гипоперфузия головного мозга при артериальной гипертензии. Некоторые аспекты лечебной тактики / В. И. Козловский // Медицина (Алматы). – 2018. – № 8(194). – С. 54–55.

37. Коммуникация нейронов поля СА3 гиппокампа головного мозга белых крыс после острой ишемии / А. С. Степанов, В. А. Акулинин, С. С. Степанов [и др.] // Общая реаниматология. – 2018. – Т. 14. – № 5. – С. 38–49.

38. 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.

39. Криштоп, В. В. Динамика структурных изменений коры головного мозга крыс в условиях экспериментальной модели ишемии нервной ткани / В. В. Криштоп, Т. А. Румянцева, В. И. Демидов // Морфология. – 2016. – Т. 149. – № 3. – С. 114.

40. Криштоп, В. В. Изменения клеточного состава коры головного мозга у крыс с разным уровнем когнитивных функций при церебральной гипоперфузии / В. В. Криштоп, В. Г. Никонорова, Т. А. Румянцева // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2019. – Т. 8. – № 4. – С. 22–29.

41. Кузин, А. В. Ансамблевые взаимодействия в центральной нервной системе / А. В. Кузин, Ю. Г. Васильев, В. М. Чучков, Т. Г. Шорохова // Ижевск,

Берлин: АНК, 2004. – С. 16.

42. Ловрикова, М. А. Атеросклероз брахиоцефальных сосудов: классификация, ультразвуковая диагностика, стандарты лечения / М. А. Ловрикова, К. В. Жмеренецкий, С. С. Рудь // Дальневосточный медицинский журнал. – 2015. – № 4. – С. 118–123.

43. Марченко, В. Г. Синхронизация и распространение электрических потенциалов в нейронных сетях коры мозга / В. Г. Марченко, М. И. Зайченко // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2014. – Т. 64. – № 3. – С. 255.

44. Матвеев, Ю. А. Нейро-глие-вазальная трансмиссия и регуляция церебрального кровотока / Ю. А. Матвеев, Д. Г. Павлуш, И. В. Ковалева // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2021. – Т. 15. – № 6. – С. 108–116.

45. Методы моделирования острой ишемии головного мозга: патофизиологическое обоснование выбора и значение для клинической практики / Б. И. Гельцер, Э. В. Слабенко, Ю. В. Заяц, В. Н. Котельников // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – Т. 63. – № 2. – С. 142–152. – DOI 10.25557/0031–2991.2019.02.153–158.

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

47. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 1 / Е. В. Шляхто, Е. Р. Баранцевич, Н. С. Щербак, М. М. Галагудза // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 67. – № 6. – С. 42–50.

48. Морфологическая характеристика изменений нейронов мозга крыс при четырёхсосудистой модели церебральной ишемии и их коррекция тадалафилом в эксперименте / О. В. Мартынова, М. А. Мартынов, А. С. Солгалова [и др.] // Фармакология живых систем: 6 лет пассионарного развития : сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным

участием, Белгород, 09–13 апреля 2018 года ; под ред. М. В. Покровского. – Белгород : Издательский дом "Белгород", 2018. – С. 102–105.

49. Морфологические изменения в тканях головного мозга при экспериментальной ишемии / М. М. Шертаев, У. К. Ибрагимов, С. Х. Икрамова [и др.] // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2015. – № 1 (23). – С. 72–79. – DOI 10.15293/2226–3365.1501.07.

50. Морфологические изменения нейронов головного мозга крыс при двух-, четырёхсосудистой моделях ишемического повреждения головного мозга крыс и их коррекция тадалафилом в эксперименте / О. В. Мартынова, А. В. Тверской, М. В. Покровский [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 242.

51. 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. – DOI 10.23934/2223–9022–2020–9–2–251–258.

52. Ноздрачев, А. Д. Анатомия крысы (Лабораторные животные) / А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Поляков ; под ред. А. Д. Ноздрачева. – СПб. : Лань, 2001. – 464 с.

53. О роли астроглии в головном мозге в норме и патологии / С. А. Горяйнов, С. В. Процкий, В. Е. Охотин [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2013. – Т. 7. – № 1. – С. 45–51.

54. Обухов, Д. К. Современные представления о развитии, структуре и эволюции неокортекса конечного мозга млекопитающих животных и человека / Д. К. Обухов // Сборник научных трудов, посвященный 100-летию кафедры медицинской биологии СПбГМА им. И. И. Мечникова. Вопросы морфологии XXI века. – Санкт-Петербург, 2009. – Вып. 1. – С. 200–223.

55. Оленев, С. Н. Конструкция мозга / С. Н. Оленев. – Л. : Медицина, 1987. – 206 с.

56. Особенности экспрессии коннексинов клетками нейроваскулярной единицы в норме и при гипоксии в условиях эксперимента / А. В. Моргун, Н. В. Кувачева, Е. Д. Хилажева [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13. – № 6. – С. 5–9.

57. Пизова, Н. В. Хронические цереброваскулярные заболевания: патогенетические механизмы, клинические проявления и подходы к терапии / Н. В. Пизова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 83–89.

58. Питерс, А. Ультраструктура нервной системы / А. Питерс, С. Палей, Г. Уэбстер : пер. с англ. М. В. Викторова ; под ред. Г. Д. Смирнова. – Москва : Мир, 1972. – 175 с.

59. Поляков Г. И. О принципах нейронной организации мозга / Г. И. Поляков. – М. : Медицина, 1965. – 488 с.

60. Проявление отека–набухания сенсомоторной коры большого мозга крыс в зависимости от длительности окклюзии общих сонных артерий (морфометрическое исследование) / С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин [и др.] // Общая реаниматология. – 2021. – Т. 17. – № 5. – С. 111–128.

61. Реорганизация астроцитов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий / С. С. Степанов, В. А. Акулинин, Д. Б. Авдеев [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2019. – Т. 105. – № 5. – С. 578–590.

62. 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.

63. Рукан, Т. А. Морфофункциональные изменения нейронов фронтальной коры головного мозга крыс в условиях его ишемии-реперфузии / Т. А. Рукан, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2012. – № 4 (40). – С. 35–38.

64. Саркисов, Д. С. Регенерация и ее клиническое значение /

Д. С. Саркисов. – М. : «Издательство «Медицина», 1970. – С. 281.

65. Светухина В. М. Цитоархитектоника новой коры мозга в отряде грызунов (белая крыса) / В. М. Светухина // Архив анатомии, гистологии эмбриологии. – 1962. – Том XLII. – № 2. – С. 31–44.

66. 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.

67. Снесарев, П. Е. Общая гистопатология мозговой травмы / П. Е. Снесарев. – Медгиз, 1946. – 161 с.

68. Сравнительная характеристика гистологических изменений нейронов коры головного мозга крыс при его тотальной ишемии и механической асфиксии / М. А. Федото, Н. Е. Максимович, Е. И. Бонь, А. И. Грищенко // Кислород и свободные радикалы : сборник материалов научно–практической конференции с международным участием, Гродно, 26–27 мая 2022 года ; под ред. В. В. Зинчука. – Гродно : Гродненский государственный медицинский университет, 2022. – С. 172–174.

69. 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. – DOI 10.18499/2225-7357-2020-9-4-19-30.

70. Старчина, Ю. А. Когнитивные нарушения при артериальной гипертензии / Ю. А. Старчина, В. В. Захаров // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2021. – Т. 13. – № 1. – С. 113–118.

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

72. Структурная организация поверхностной глиальной пограничной мембраны и астроцитов i слоя коры большого мозга крысы / Е. Г. Сухорукова,

О. С. Алексеева, О. В. Кирик [и др.] // Морфология. – 2011. – Т. 140. – № 6. – С. 32–35.

73. Структурные основы изменения межнейронной коммуникации нейронов поля СА3 гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы / С. С. Степанов, И. П. Кошман, А. Ю. Шоронова [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т. 65. – № 1. – С. 22–34.

74. Структурно–функциональные изменения нейронов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий / А. С. Степанов, Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин, С. С. Степанов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т. 62. – № 2. – С. 30–38.

75. Темные нейроны сенсомоторной коры белых крыс после острой неполной ишемии в аспекте артефактов фиксации и нейроглиальных взаимоотношений / Д. Б. Авдеев, С. С. Степанов, А. В. Горбунова [и др.] // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2021. – Т. 10. – № 2. – С. 9–22.

76. Трушель, Н. А. Сравнительная характеристика строения сосудов виллизиева круга головного мозга у человека и лабораторных животных / Н. А. Трушель // Военная медицина. – 2009. – № 2 (11). – С. 47–51.

77. Цитоархитектоника различных долей коры головного мозга человека при хронической ишемии / В. А. Акулинин, А. В. Сергеев, С. С. Степанов [и др.] // Омский научный вестник. – 2015. – № 2 (144). – С. 5–9.

78. Чиженкова, Р. А. Структурно-функциональная организация сенсомоторной коры (морфологический, электрофизиологический, нейромедиаторный аспекты) / Р. А. Чиженкова. – М. : Наука, 1986. – 249 с.

79. Чухонцева, Е. С. Нейровизуализационные паттерны хронической недостаточности мозгового кровообращения с оценкой церебральной перфузии в зависимости от уровня когнитивных расстройств / Е. С. Чухонцева, Т. Г. Морозова, А. В. Борсуков // Медицинская визуализация. – 2020. – Т. 24. – № 3. – С. 114–122.

80. 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.

81. Abbott, N. J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier / N. J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson // *Nat Rev Neurosci.* – 2006. – № 7 (1). – P. 41–53.

82. Abbott, N. J. Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease / N. J. Abbott, A. Friedman // *Epilepsia.* – 2012. – Vol. 53. – Suppl. 6 (06). – P. 1–6.

83. Adeva, M. M. Brain edema in diseases of different etiology / M. M. Adeva, G. Souto, C. Donapetry // *Neurochem Int.* – 2012. – Vol. 61 (2). – P. 166–174.

84. Alia, C. Cell-to-Cell Interactions Mediating Functional Recovery after Stroke / C. Alia, D. Cangì, V. Massa // *Cells.* – 2021. – Vol. 10 (11). – P. 3050.

85. Allen, N. J. Glia as architects of central nervous system formation and function / N. J. Allen, D. A. Lyons // *Lyons Science.* – 2018. – Vol. 362 (6411). – P. 181–185.

86. Amtul, Z. Pathological Changes in Microvascular Morphology, Density, Size and Responses Following Comorbid Cerebral Injury / Z. Amtul, J. Yang, T. Y. Lee // *Front Aging Neurosci.* – 2019. – Vol. 11. – P. 47.

87. Anatomical arrangement and distribution of the cerebral arterial circle in rats / A. Esteves, A. Freitas, W. Rossi-Junior [et al.] // *J. Morphol. Sci.* – 2013. – Vol. 32. – № 2. – P. 132–139.

88. Argandoña, E. G. Effects of dark-rearing on the vascularization of the developmental rat visual cortex / E. G. Argandoña, J. V. Lafuente // *Brain Res.* – 1996. – Vol. 732 (1-2). – P. 43–51.

89. Armstead, W. M. Endothelin and the neurovascular unit in pediatric traumatic brain injury / W. M. Armstead, R. Raghupathi // *Neurol Res.* – 2011. – Vol. 33 (2). – P. 127–32.

90. Avrushchenko, M. Sh. Significance of Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF) in The Development of Postresuscitation Changes in Population of Cerebellar Purkinje Cells / M. Sh. Avrushchenko, I. V. Ostrova // *General Reanimatology.* – 2016. – Vol. 12. – № 1. – P. 8–15.

91. Bain, J. M. Vascular endothelial growth factors A and C are induced in the SVZ following neonatal hypoxia-ischemia and exert different effects on neonatal glial progenitors / J. M. Bain, L. Moore, Z. Ren [et al.] // *Transl Stroke Res.* – 2013. – Vol. 4 (2). – P. 158–170.
92. Bakiri, Y. Testing NMDA receptor block as a therapeutic strategy for reducing ischaemic damage to CNS white matter / Y. Bakiri, N. B. Hamilton, R. Káradóttir // *Glia.* – 2008. – Vol. 56 (2). – P. 233–240.
93. Bär, T. Morphometric evaluation of capillaries in different laminae of rat cerebral cortex by automatic image analysis: changes during development and aging / T. Bär // *Adv Neurol.* – 1978. – Vol. 20. – P. 1–9.
94. Baron, J. C. Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease / J. C. Baron, H. Yamauchi, M. Fujioka // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2014. – Vol. 34 (1). – P. 2–18.
95. Barreto, G. E. Astrocyte proliferation following stroke in the mouse depends on distance from the infarct / G. E. Barreto, X. Sun, L. Xu // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6 (11). – P. e27881.
96. Becerra-Calixto, A. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy / A. Becerra-Calixto, G. P. Cardona-Gómez // *Front Mol Neurosci.* – 2017. – Vol. 10. – P. 88.
97. Belov Kirdajova, D. Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells / D. Belov Kirdajova, J. Kriska, J. Tureckova // *Front Cell Neurosci.* – 2020. – Vol. 14. – P. 51.
98. Ben Haim, L. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases / L. Ben Haim, M. A. Carrillo-de Sauvage, K. Ceyzériat // *Front Cell Neurosci.* – 2015. – Vol. 9. – P. 278.
99. Bennett, S. A. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment / S. A. Bennett, M. Tenniswood, J. H. Chen // *Neuroreport.* – 1998. – Vol. 9 (1). – P. 161–166.
100. Bennett, H. S. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries / H. S. Bennett, J. H. Luft, J. C. Hampton // *Am J Physiol.* – 1959. – Vol. 196 (2). –

P. 381–390.

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

102. Biswas, S. K. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm / S. K. Biswas, A. Mantovani // *Nat Immunol.* – 2010. Vol. 11 (10). – P. 889–896.

103. Bolon, B. Ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. A 'best practices' approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing-for today / B. Bolon, R. Garman, K. Jensen // *Toxicol Pathol.* – 2006. – Vol. 34 (3). – P. 296–313.

104. Budd, S. L. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells / S. L. Budd, D. G. Nicholls // *J Neurochem.* – 1996. – Vol. 67 (6). – P. 2282–2291.

105. Calhoun, M. E. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses / M. E. Calhoun, M. Jucker, L. J. Martin // *J Neurocytol.* – 1996. – Vol. 25 (12). – P. 821–828.

106. Cao, Z. Inflammatory Responses in the Secondary Thalamic Injury After Cortical Ischemic Stroke / Z. Cao, S. S. Harvey, T. M. Bliss // *Front Neurol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 236.

107. Chamorro, Á. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation / Á. Chamorro, U. Dirnagl, X. Urra // *Lancet Neurol.* – 2016. – Vol. 15 (8). – P. 869–881.

108. Chen, C. The Roles of GABA in Ischemia-Reperfusion Injury in the Central Nervous System and Peripheral Organs / C. Chen, X. Zhou, J. He // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 4028394.

109. Chen, K. S. Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion / K. S. Chen, E. Masliah, M. Mallory // *Neuroscience.* – 1995. – Vol. 68 (1). – P. 19–27.

110. Choudhury, G. R. Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal

ischemic stroke / G. R. Choudhury, S. Ding // *Neurobiol Dis.* – 2016. – Vol. 85. – P. 234–244.

111. Clausen, B. H. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice / B. H. Clausen, K. L. Lambertsen, A. A. Babcock // *J Neuroinflammation.* – 2008. – Vol. 5. – P. 46.

112. Cole, J. H. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury / J. H. Cole, A. Jolly, S. de Simoni // *Brain.* – 2018. – Vol. 141 (3). – P. 822–836.

113. Colonna, M. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration / M. Colonna, O. Butovsky // *Annu Rev Immunol.* – 2017. – Vol. 35. – P. 441–468.

114. Deng, Y. Amoeboid microglia in the periventricular white matter induce oligodendrocyte damage through expression of proinflammatory cytokines via MAP kinase signaling pathway in hypoxic neonatal rats / Y. Deng, J. Lu, V. Sivakumar // *Brain Pathol.* – 2008. – Vol. 18 (3). – 387–400.

115. Ding, Y. Evolutionary Adaptation of Aquaporin-4 in Yak (*Bos grunniens*) Brain to High-Altitude Hypoxia of Qinghai-Tibetan Plateau / Y. Ding, J. Liu, Y. Xu // *High Alt Med Biol.* – 2020. – Vol. 21 (2). – P. 167–175.

116. Dreier, J. P. Spreading depolarization is not an epiphenomenon but the principal mechanism of the cytotoxic edema in various gray matter structures of the brain during stroke / J. P. Dreier, C. L. Lemale, V. Kola // *Neuropharmacology.* – 2018. – Vol. 134 (Pt B). – P. 189–207.

117. Duncombe, J. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia / J. Duncombe, A. Kitamura, Y. Hase // *Clin Sci (Lond).* – 2017. – Vol. 131 (19). – P. 2451–2468.

118. Farkas, E. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases / E. Farkas, P. G. Luiten, F. Bari // *Brain Res Rev.* – 2007. – Vol. 54 (1). – P. 162–180.

119. Fernández, E. Are neurons multifractals? / E. Fernández, J. A. Bolea, G. Ortega // *J Neurosci Methods*. – 1999. – Vol. 89 (2). – P. 151–157.
120. Fluri, F. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research / F. Fluri, M. K. Schuhmann, C. Kleinschnitz // *Drug Des Devel Ther*. – 2015. – Vol. 9. – P. 3445–3454.
121. Gao, Y. Pathological mechanism of focal cerebral ischemia and reperfusion injuries in mice / Y. Gao, L. L. Wen, X. Yang // *J Biol Regul Homeost Agents*. – 2019. – Vol. 33 (5). – P. 1507–1513.
122. Garcia, J. H. Cellular events during partial cerebral ischemia. I. Electron microscopy of feline cerebral cortex after middle-cerebral-artery occlusion / J. H. Garcia, H. Kalimo, Y. Kamijyo // *Virchows Arch B Cell Pathol*. – 1977. – Vol. 25 (3). – P. 191–206.
123. Giaume, C. Glia: the fulcrum of brain diseases / C. Giaume, F. Kirchhoff, C. Matute // *Cell Death Differ*. – 2007. – Vol. 14 (7). – P. 1324–1335.
124. Girouard, H. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease / H. Girouard, C. Iadecola // *J Appl Physiol* (1985). – 2006. – Vol. 100 (1). – P. 328–335.
125. Gleichmann, M. Neuronal calcium homeostasis and dysregulation / M. Gleichmann, M. P. Mattson // *Antioxid Redox Signal*. – 2011. – Vol. 14 (7). – P. 1261–1273.
126. Gong, H. Bilateral internal carotid arteries ligation temporary impairs brain vasculature in young rats / H. Gong, L. Shu, H. Xu // *Auton Neurosci*. – 2013. – Vol. 173 (1-2). – P. 39–44.
127. Gordon, S. Monocyte and macrophage heterogeneity / S. Gordon, P. R. Taylor // *Nat Rev Immunol*. – 2005. – Vol. 5 (12). – P. 953–964.
128. Guillamón-Vivancos, T. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description / T. Guillamón-Vivancos, U. Gómez-Pinedo, J. Matías-Guiu // *Neurologia*. – 2015. – Vol. 30 (2). – P. 119–129.
129. Hacke, W. Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2):

a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study / W. Hacke, A. J. Furlan, Y. Al-Rawi [et al.] // *Lancet Neurol.* – 2009. – Vol. 8 (2). – P. 141–150.

130. Hagemeyer, N. Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood / N. Hagemeyer, K. M. Hanft, M. A. Akriditou // *Acta Neuropathol.* – 2017. – Vol. 134 (3). – P. 441–458.

131. Hankey, G. J. Stroke / G. J. Hankey // *Lancet.* – 2017. – Vol. 389 (10069). – P. 641–654.

132. 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.

133. He, Z. A Working Module for the Neurovascular Unit in the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area / Z. He, L. Cui, S. A. Ferguson // *Mol Neurobiol.* – 2018. – Vol. 55 (1). – P. 156–163.

134. Hendriks, D. Measurement of Neurovascular Coupling in Neonates / D. Hendriks, A. Smits, M. Lavanga // *Front Physiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 65.

135. Hinzman, J. M. Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions / J. M. Hinzman, V. A. DiNapoli, E. J. Mahoney // *Exp Neurol.* – 2015. – Vol. 267. – P. 243–253.

136. Hiu, T. Enhanced phasic GABA inhibition during the repair phase of stroke: a novel therapeutic target / T. Hiu, Z. Farzampour, J. T. Paz [et al.] // *Brain.* – 2016. – Vol. 139 (Pt 2). – P. 468–480.

137. Hocher, B. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease / B. Hocher, J. Adamski // *Nat Rev Nephrol.* – 2017. – Vol. 13 (5). – P. 269–284.

138. Hossmann, K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia / K. A. Hossmann // *Cardiovasc Res.* – 1998. – Vol. 39 (1). – P. 106–120.

139. Hu, X. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia / X. Hu, P. Li, Y. Guo // *Stroke.* – 2012. – Vol. 43 (11). – P. 3063–3070.

140. Iadecola, C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease / C. Iadecola // *Nat Rev Neurosci.* – 2004. – Vol. 5 (5). – P. 347–360.

141. Imai, Y. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1 / Y. Imai, S. Kohsaka // *Glia*. – 2002. – Vol. 40 (2). – P. 164–174.
142. Ito, D. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain / D. Ito, K. Tanaka, S. Suzuki // *Stroke*. – 2001. – Vol. 32 (5). – P. 1208–1215.
143. Ito, U. Degeneration of astrocytic processes and their mitochondria in cerebral cortical regions peripheral to the cortical infarction: heterogeneity of their disintegration is closely associated with disseminated selective neuronal necrosis and maturation of injury / U. Ito, Y. Hakamata, E. Kawakami // *Stroke*. – 2009. – Vol. 40 (6). – P. 2173–2181.
144. Jalal, F. Y. Myelin loss associated with neuroinflammation in hypertensive rats / F. Y. Jalal, Y. Yang, J. Thompson // *Stroke*. – 2012. – Vol. 43 (4). – P. 1115–1122.
145. Jessen, K. R. Glial cells / K. R. Jessen // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2004. – Vol. 36 (10). – P. 1861–1867.
146. Jha, M. K. Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: Implications in brain health and diseases / M. K. Jha, J. H. Kim, G. J. Song // *Prog Neurobiol*. – 2018. – Vol. 162. – P. 37–69.
147. Jha, M. K. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders / M. K. Jha, W. H. Lee, K. Suk // *Biochem Pharmacol*. – 2016. – Vol. 103. – P. 1–16.
148. Ji, K. Microglia actively regulate the number of functional synapses / K. Ji, G. Akgul, L. P. Wollmuth // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8 (2). – P. e56293.
149. Jin, X. Microglia in central nervous system repair after injury / X. Jin, T. Yamashita // *J Biochem*. – 2016. – Vol. 159 (5). – P. 491–496.
150. Jing, Z. Chronic cerebral hypoperfusion induces vascular plasticity and hemodynamics but also neuronal degeneration and cognitive impairment / Z. Jing, C. Shi, L. Zhu [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2015. – Vol. 35 (8). – P. 1249–1259.
151. Jiwa, N. S. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review / N. S. Jiwa, P. Garrard, A. H. Hainsworth // *J Neurochem*. – 2010. – Vol. 115 (4). – P. 814–828.

152. Jordan, W. H. Preparation and analysis of the central nervous system / W. H. Jordan, J. K. Young, M. J. Hyten // *Toxicol Pathol.* – 2011. – Vol. 39 (1). – P. 58–65.
153. Joshi, A. U. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration / A. U. Joshi, P. S. Minhas, S. A. Liddelow // *Nat Neurosci.* – 2019. – Vol. 22 (10). – P. 1635–1648.
154. Kalaria, R. N. The pathology and pathophysiology of vascular dementia / R. N. Kalaria // *Neuropharmacology.* – 2018. – Vol. 134 (Pt B). – P. 226–239.
155. Karperien, A. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis / A. Karperien, H. Ahammer, H. F. Jelinek // *Front Cell Neurosci.* – 2013. – Vol. 7. – P. 3.
156. Kato, H. Quantitative measurement of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in a rat model of cerebral hypoperfusion / H. Kato, Y. Kanai, T. Watabe // *Brain Res.* – 2019. – Vol. 1719. – P. 208–216.
157. Keep, R. F. This was the year that was: brain barriers and brain fluid research in 2019 / R. F. Keep, H. C. Jones, L. R. Drewes // *Fluids Barriers CNS.* – 2020. – Vol. 17 (1). – P. 20.
158. Knott, G. Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling / G. Knott, H. Marchman, D. Wall // *J Neurosci.* – 2008. – Vol. 28 (12). – P. 2959–2964.
159. 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.
160. Kreshuk, A. Automated detection and segmentation of synaptic contacts in nearly isotropic serial electron microscopy images / A. Kreshuk, C. N. Straehle, C. Sommer // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6 (10). – P. e24899.
161. Krueger, M. Endothelial edema precedes blood-brain barrier breakdown in early time points after experimental focal cerebral ischemia / M. Krueger, B. Mages, C. Hobusch // *Acta Neuropathol Commun.* – 2019. – Vol. 7 (1). – P. 17.
162. Lalancette-Hébert, M. Selective ablation of proliferating microglial cells

exacerbates ischemic injury in the brain / M. Lalancette-Hébert, G. Gowing, A. Simard // *J Neurosci.* – 2007. – Vol. 27 (10). – P. 2596–2605.

163. Lambertsen, K. L. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke / K. L. Lambertsen, K. Biber, B. Finsen // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2012. – Vol. 32 (9). – P. 1677–1698.

164. Lambertsen, K. L. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? / K. L. Lambertsen, B. Finsen, B. H. Clausen // *Acta Neuropathol.* – 2019. – Vol. 137 (5). – P. 693–714.

165. Lee, S. A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers / S. Lee, M. K. Leach, S. A. Redmond // *Nat Methods.* – 2012. – Vol. 9 (9). – P. 917–922.

166. Lee, Y. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration / Y. Lee, B. M. Morrison, Y. Li // *Nature.* – 2012. – Vol. 487 (7408). – P. 443–448.

167. Li, H. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice / H. Li, N. Zhang, H. Y. Lin // *BMC Neurosci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 58.

168. Li, Q. Effects of neuregulin on expression of MMP-9 and NSE in brain of ischemia/reperfusion rat / Q. Li, R. Zhang, Y. L. Ge // *J Mol Neurosci.* – 2009. – Vol. 38 (2). – P. 207–215.

169. Li, Z. 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 // *Theranostics.* – 2021. – Vol. 11 (3). – P. 1232–1248.

170. Liddelow, S. A. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential / S. A. Liddelow, B. A. Barres // *Immunity.* – 2017. – Vol. 46 (6). – P. 957–967.

171. Liddelow, S. A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia / S. A. Liddelow, K. A. Guttenplan, L. E. Clarke // *Nature.* – 2017. – Vol. 541 (7638). – P. 481–487.

172. Liu, S. The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke /

S. Liu, D. Agalliu, C. Yu / *Curr Pharm Des.* – 2012. – Vol. 18 (25). – P. 3653–3662.

173. Liu, Z. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke / Z. Liu, M. Chopp // *Prog Neurobiol.* – 2016. – Vol. 144. – P. 103–120.

174. Loane, D. J. Metabotropic glutamate receptor-mediated signaling in neuroglia / D. J. Loane, B. A. Stoica, A. I. Faden // *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* – 2012. – Vol. 1 (2). – P. 136–150.

175. Ma, Y. The biphasic function of microglia in ischemic stroke / Y. Ma, J. Wang, Y. Wang // *Prog Neurobiol.* – 2017. – Vol. 157. – P. 247–272.

176. Mandelbrot, B. B. Stochastic models for the Earth's relief, the shape and the fractal dimension of the coastlines, and the number-area rule for islands / B. B. Mandelbrot // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1975. – Vol. 72 (10). – P. 3825–388.

177. Mao, T. Long-range neuronal circuits underlying the interaction between sensory and motor cortex / T. Mao, D. Kusefoglou, B. M. Hooks // *Neuron.* – 2011. – Vol. 72 (1). – P. 111–123.

178. Mayhew, T. M. Basic stereological relationships for quantitative microscopical anatomy—a simple systematic approach / T. M. Mayhew // *J Anat.* – 1979. – Vol. 129 (Pt 1). – P. 95–105.

179. Merchán-Pérez, A. Counting Synapses Using FIB/SEM Microscopy: A True Revolution for Ultrastructural Volume Reconstruction / A. Merchán-Pérez, J. R. Rodriguez, L. Alonso-Nanclares // *Front Neuroanat.* – 2009. – Vol. 3. – P. 18.

180. Mestriner, R. G. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage / R. G. Mestriner, A. S. Pagnussat, L. S. Boisserand // *Exp Neurol.* – 2011. – Vol. 227 (1). – P. 53–61.

181. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 2011 Mar;93(3):421–43.

182. Mifsud, G. Oligodendrocyte pathophysiology and treatment strategies in cerebral ischemia / G. Mifsud, C. Zammit, R. Muscat // *CNS Neurosci Ther.* – 2014. – Vol. 20 (7). – P. 603–612.

183. Miron, V. E. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination / V. E. Miron, A. Boyd, J. W. Zhao // *Nat Neurosci.* – 2013. – Vol. 16 (9). – P. 1211–1218.

184. Mishchenko, Y. Automation of 3D reconstruction of neural tissue from large volume of conventional serial section transmission electron micrographs / Y. Mishchenko // *J Neurosci Methods.* – 2009. – Vol. 176 (2). – P. 276–289.

185. Murray, N. M. Artificial intelligence to diagnose ischemic stroke and identify large vessel occlusions: a systematic review / N. M. Murray, M. Unberath, G. D. Hager // *J Neurointerv Surg.* – 2020. – Vol. 12 (2). – P. 156–164.

186. Nakagawa, S. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. – *Neurochem Int.* – 2009. – Vol. 54 (3-4). – P. 253–263.

187. Nakajima, K. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system / K. Nakajima, S. Kohsaka // *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* – 2004. – Vol. 4 (1). – P. 65–84.

188. Nedergaard, M. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain / M. Nedergaard, B. Ransom, S. A. Goldman // *Trends Neurosci.* – 2003. – Vol. 26 (10). – P. 523–530.

189. Neuro-Glio-Vascular Complexes of the Brain After Acute Ischemia / A. S. Stepanov, V. A. Akulinin, A. V. Mysik [et al.] // *General Reanimatology.* – 2017. – Vol. 13. – № 6. – P. 6–17. DOI 10.15360/1813-9779-2017-6-6-17.

190. Nolte, C. Complement 5a controls motility of murine microglial cells in vitro via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton / C. Nolte, T. Möller, T. Walter // *Neuroscience.* – 1996. – Vol. 73 (4). – P. 1091–1107.

191. Norden, D. M. TGF β produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation / D. M. Norden, A. M. Fenn, A. Dugan // *Glia.* – 2014. – Vol. 62 (6). – P. 881–895.

192. Norton, W. T. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review / W. T. Norton, D. A. Aquino, I. Hozumi // *Neurochem Res.* – 1992. – Vol. 17 (9). –

P. 877–885.

193. Ogata, K. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus / K. Ogata, T. Kosaka // *Neuroscience*. – 2002. – Vol. 113 (1). – P. 221–233.

194. Ohta, H. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats / H. Ohta, H. Nishikawa, H. Kimura // *Neuroscience*. – 1997. – Vol. 79 (4). – P. 1039–1050.

195. Ostergaard, P. J. Histological quantification of astrocytosis after cerebral infarction: a systematic review / P. J. Ostergaard, M. B. Jensen // *Int J Neurosci*. – 2013. – Vol. 123 (7). – P. 439–443.

196. Ostrova, I. Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Increases the Resistance of Neurons to Death in the Postresuscitation Period / I. Ostrova, M. Sh. Avrushchenko // *General Reanimatology*. – 2015. – Vol. 11. – № 3. – P. 45–53. DOI 10.15360/1813-9779-2015-3-45-53.

197. Parpura, V. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes / V. Parpura, R. Zorec // *Brain Res Rev*. – 2010. – Vol. 63 (1-2). – P. 83–92.

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

199. Pedata, F. Purinergic signalling in brain ischemia / F. Pedata, I. Dettori, E. Coppi // *Neuropharmacology*. – 2016. – Vol. 104. – P. 105–130.

200. Pekny, M. Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke? / M. Pekny, U. Wilhelmsson, T. Tatlisumak // *Neurosci Lett*. – 2019. – Vol. 689. – P. 45–55.

201. Pelvig, D. P. Neocortical glial cell numbers in human brains / D. P. Pelvig, H. Pakkenberg, A. K. Stark // *Neurobiol Aging*. – 2008. – Vol. 29 (11). – P. 1754–1762.

202. Perego, C. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice / C. Perego, S. Fumagalli, M. G. De Simoni // *J Neuroinflammation*. – 2011. – Vol. 10. – № 8. – P. 174.

203. Petito, C. K. Early proliferative changes in astrocytes in postischemic

noninfarcted rat brain / C. K. Petito, T. Babiak // *Ann Neurol.* – 1982. – Vol. 11 (5). – P. 510–518.

204. Pirici, D. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia / D. Pirici, L. Mogoantă, O. Mărgăritescu // *Rom J Morphol Embryol.* – 2009. – Vol. 50 (3). – P. 381–390.

205. Qian, H. Z. Postischemic Housing Environment on Cerebral Metabolism and Neuron Apoptosis after Focal Cerebral Ischemia in Rats / H. Z. Qian, H. Zhang, L. L. Yin // *Curr Med Sci.* – 2018. – Vol. 38 (4). – P. 656–665.

206. Rami, A. Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? / A. Rami // *Neuropathol Appl Neurobiol.* – 2009. – Vol. 35 (5). – P. 449–461.

207. Ransohoff, R. M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? / R. M. Ransohoff // *Nat Neurosci.* – 2016. – Vol. 19 (8). – P. 987–991.

208. Ritzel, R. M. Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke / R. M. Ritzel, A. R. Patel, J. M. Grenier // *J Neuroinflamm.* – 2015. – Vol. 12. – P. 106.

209. Rothman, S. M. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage / S. M. Rothman, J. W. Olney // *Ann Neurol.* – 1986. – Vol. 19 (2). – P. 105–111.

210. Simard, M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis / M. Simard, M. Nedergaard // *Neuroscience.* – 2004. – Vol. 129 (4). – P. 877–896.

211. Smith, T. G. Jr. Fractal methods and results in cellular morphology-dimensions, lacunarity and multifractals / T. G. Jr Smith, G. D. Lange, W. B. Marks // *J Neurosci Methods.* – 1996. – Vol. 69 (2). – P.123–136.

212. Sofroniew, M. V. Reactive astrocytes in neural repair and protection / M. V. Sofroniew // *Neuroscientist.* – 2005. – Vol. 11 (5). – P. 400–407.

213. Song, M. K. Neurovascular integrative effects of long-term environmental enrichment on chronic cerebral hypoperfusion rat model / M. K. Song, Y. J. Kim, J. M. Lee // *Brain Res Bull.* – 2020. – Vol. 163. – P. 160–169.

214. Song, M. K. Neurovascular integrative effects of long-term environmental

enrichment on chronic cerebral hypoperfusion rat model / M. K. Song, Y. J. Kim, J. M. Lee // *Brain Res Bull.* – 2020. – Vol. 163. – P. 160–169.

215. Steliga, A. Neurovascular Unit as a Source of Ischemic Stroke Biomarkers-Limitations of Experimental Studies and Perspectives for Clinical Application / A. Steliga, P. Kowiański, E. Czuba // *Transl Stroke Res.* – 2020. – Vol. 11 (4). – P. 553–579.

216. Stence, N. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices / N. Stence, M. Waite, M. E. Dailey // *Glia.* – 2001. – Vol. 33 (3). – P. 256–266.

217. Takano, T. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow / T. Takano, G. F. Tian, W. Peng // *Nat Neurosci.* – 2006. – Vol. 9 (2). – P. 260–267.

218. 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.

219. Tiwari, N. Experimental Rodent Models of Vascular Dementia: A Systematic Review / N. Tiwari, J. Upadhyay, M. N. Ansari // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* – 2021. – Vol. 20 (7). – P. 657–672.

220. Tsuyama, J. Pivotal role of innate myeloid cells in cerebral post-ischemic sterile inflammation / J. Tsuyama, A. Nakamura, H. Ooboshi // *Semin Immunopathol.* – 2018. – Vol. 40 (6). – P. 523–538.

221. Ustun, C. NEUROwords Dr. Thomas Willis' famous eponym: the circle of Willis / C. Ustun // *J Hist Neurosci.* – 2005. – Vol. 14 (1). – P. 16–21.

222. Vainchtein, I. D. Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development / I. D. Vainchtein, G. Chin, F. S. Cho // *Science.* – 2018. – Vol. 359 (6381). – P. 1269–1273.

223. von Bartheld, C. S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting / C. S. von Bartheld, J. Bahney, S. Herculano-Houzel // *J Comp Neurol.* – 2016. – Vol. 524 (18). – P. 3865–3895.

224. Wagner, D. C. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury / D. C. Wagner, J. Scheibe, I. Glocke // *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. – 2013. – Vol. 73 (1). – P. 79–87.
225. Wagner, D. C. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury / D. C. Wagner, J. Scheibe, I. Glocke // *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. – 2013. – Vol. 73 (1). – P. 79–87.
226. Walker, F. R. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms / F. R. Walker, S. B. Beynon, K. A. Jones // *Brain Behav Immun*. – 2014. – Vol. 37. – P. 1–14.
227. Wang, Y. F. Astroglial Modulation of Hydromineral Balance and Cerebral Edema / Y. F. Wang, V. Parpura // *Front Mol Neurosci*. – 2018. – Vol. 11. – P. 204.
228. Washida, K. Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion: From Mouse to Primate / K. Washida, Y. Hattori, M. Ihara // *Int J Mol Sci*. – 2019. – Vol. 20 (24). – P. 6176.
229. Waxman, S. G. Molecular dissection of the myelinated axon / S. G. Waxman, J. M. Ritchie // *Ann Neurol*. – 1993. – Vol. 33 (2). – P. 121–136.
230. Weibel, E. R. Stereological methods. Practical methods for biological morphometry / E. R. Weibel // London: Academic Press. – 1979. – 415 p.
231. Wester, J. C. Columnar interactions determine horizontal propagation of recurrent network activity in neocortex / S. G. Waxman, J. M. Ritchie // *J Neurosci*. – 2012. – Vol. 32 (16). – P. 5454–5471.
232. Wolburg, H. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes / H. Wolburg, J. Neuhaus, U. Kniesel // *J Cell Sci*. – 1994. – Vol. 107 (Pt 5). – P. 1347–57.
233. Wolburg, H. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex / H. Wolburg, S. Noell, A. Mack // *Cell Tissue Res*. – 2009. – Vol. 335 (1). – P. 75–96.
234. Xu, S. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke / S. Xu, J. Lu, A. Shao // *Front Immunol*. – 2020. – Vol. 11. – P. 294.
235. Yang, Y. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mediates the death of

immature oligodendrocytes via TNF- α /TACE in focal cerebral ischemia in mice / Y. Yang, F. Y. Jalal, J. F. Thompson // *J Neuroinflammation*. – 2011. – Vol. 8. – P. 108.

236. Yun, S. P. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease / S. P. Yun, T. I. Kam, N. Panicker // *Nat Med*. – 2018. – Vol. 24 (7). – P. 931–938.

237. Zhang, L. Focal embolic cerebral ischemia in the rat / L. Zhang, R. L. Zhang, Q. Jiang // *Nat Protoc*. – 2015. – Vol. 10 (4). – P. 539–547.

238. Zhang, X. Autophagy Induced by Oxygen-Glucose Deprivation Mediates the Injury to the Neurovascular Unit / X. Zhang, C. Fu, B. Chen // *Med Sci Monit*. – 2019. – Vol. 25. – P. 1373–1382.

239. Zhao, Y. Role of the neurovascular unit in the process of cerebral ischemic injury / Y. Zhao, J. Yang, C. Li // *Pharmacol Res*. – 2020. – Vol. 160. – P. 105103.

240. Zille, M. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives / M. Zille, T. D. Farr, I. Przesdzing // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2012. – Vol. 32 (2). – P. 213–231.

241. Zilles, K. *The Cortex of the Rat. A Stereotaxic Atlas* / K. Zilles. – Springer Berlin Heidelberg : Bibliography, 1985. – 123 p.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Области коры с латеральной (А) и дорсальной (Б) поверхностей. Первичная моторная кора (Fr1, Fr3), области представительства грудной и тазовой (HL) конечностей; поля 1 (Par 1) и 2 (Par 2) теменной коры мозга крыс. Ноздрачев Д. А., 2001. С. 14
2. Рисунок 2 – Фронтальный срез головного мозга крысы. Первичная моторная кора (Fr1, Fr3), области представительства грудной (FL) и тазовой (HL) конечностей; поля 1 (Par 1) и 2 (Par 2) теменной коры. Zilles K., 1985. С. 15
3. Рисунок 3 – Архитектоническое строение моторной (А) и соматосенсорной (Б) коры головного мозга крыс. Первичная моторная кора (Fr1, Fr3), области представительства грудной (FL) и тазовой (HL) конечностей (А); поля 1 (Par 1) и 2 (Par 2) теменной коры (Б). bregma –0.3 Окраска по Нисслю. Увеличение объектива × 64. Zilles K., 1985. С. 16
4. Рисунок 4 – Дизайн исследования. С. 38
5. Рисунок 5 – Основные виды экспериментальных моделей ишемического инсульта (Liu F., McCullough L. D., 2011). С. 42
6. Рисунок 6 – Общая сонная артерия до перевязки (а) и после перевязки (б, в). С. 43
7. Рисунок 7 – Двусторонняя перевязка общей сонной артерии у крыс. С. 44
8. Рисунок 8 – Уровни приготовления серийных фронтальных срезов СМК головного мозга крыс относительно Брегмы. С. 45
9. Рисунок 9 – Структуры головного мозга крысы, охваченные при приготовлении серийных фронтальных срезов: M1 (primary motor cortex) – первичная моторная кора, M2 (secondary motor cortex) – вторичная моторная кора, S1 (primary somatosensory cortex) – первичная соматосенсорная кора, S2 (secondary somatosensory

- cortex) – вторичная соматосенсорная кора. С. 46
10. Рисунок 10 – Сенсомоторная кора мозга крысы в контроле: по методу Ниссля. Молекулярный слой, представленный нервными волокнами (I); наружный (II) и внутренний (IV) зернистые слои с преобладанием зерновидных и звездчатых нейронов; наружный (III) и внутренний (V) пирамидные слои, основными клетками которых являются пирамидные нейроны; мультиморфный слой (VI) и белое вещество (БВ). Объектив $\times 10$, шкала – 100 мкм. С. 51
11. Рисунок 11 – слой III СМК мозга крыс в контроле: преобладают нормохромные пирамидные нейроны (черные стрелки). Окраска гематоксилин-эозином, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм. С. 52
12. Рисунок 12 – Фронтальные срезы через все слои СМК мозга крысы через 1 сут (А, Ж), 3 сут (Б, З), 7 сут (В, И), 14 сут (Г, К) и 30 сут (Д, Л) после двусторонней необратимой окклюзии общих сонных артерий: интенсивно окрашенные нейроны (белые стрелки) выявляются на протяжении всех 30 сут. Окраска по методу Ниссля (А, Б, В, Г, Д), гематоксилин-эозином (Ж, З, И, К, Л), объектив $\times 10$, шкала – 100 мкм. С. 53
13. Рисунок 13 – СМК мозга крысы через 1 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий: острое набухание нейронов в слоях III (А, Г) и V (Б, В). Набухшие тела нейронов (черная стрелка) и апикальные дендриты (жёлтая стрелка). Частичный лизис тигроида, встречаются нейроны с частичным склеиванием тигроида в основании нейрона (красная стрелка). Ядра набухшие, встречается гиперхроматоз (Б, В). Гиперхромные нейроны со сморщиванием (зеленая стрелка) и без сморщивания (серая клетка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$ (А, Б), шкала – 50 мкм. $\times 100$ (В, Г), шкала – 20 мкм. С. 55
14. Рисунок 14 – слой V СМК мозга крыс через 1 сут: гиперхромные сморщенные нейроны (черная стрелка) с изменением формы ядра,

- ядрышко увеличено в размере, эксцентрично; содержание глиальных клеток: астроциты (красная стрелка), олигодендроциты (желтая стрелка), микроглиоциты (розовая стрелка); тяжёлые изменения нейрона (белая стрелка) (В). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 50 мкм. С. 56
15. Рисунок 15 – СМК кора полушарий, слой V через 1 сут: очаг «выпадения» нейронов (*) (А); клетки-тени (черная стрелка) (Б); набухание тела, ядра и апикального дендрита нейрона (белая стрелка), гомогенизация цитоплазмы в результате тигролиза, частичное склеивание тигроида в основании нейрона (Б). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$ (А), шкала – 50 мкм, $\times 100$ (Б), шкала – 20 мкм. С. 57
16. Рисунок 16 – Пирамидные нейроны в слоях III (А, Б) и V (В) СМК крыс через 3 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий: резко отёчные тела и апикальные отростки нейронов (чёрные стрелки); частичное перинуклеарное просветление цитоплазмы (белые стрелки); перицеллюлярный отек (красные стрелки); гиперхромные сморщенные нейроны (жёлтая стрелка); нейроны с тотальным тигролизом (зеленая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм. С. 58
17. Рисунок 17 – Слой V СМК мозга крыс через 3 сут: отёк нейропиля, его вакуолизация; набухание тела нейрона, цитоплазма сотовидная (черная стрелка); резко отёчен апикальный дендрит (белая стрелка), эктопия ядрышка; астроцит (красная стрелка), олигодендроцит (желтая стрелка), микроглиоцит (розовая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 50 мкм. С. 59
18. Рисунок 18 – Пирамидные нейроны в слоях III (А, Б) и V (В) СМК мозга крыс через 7 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий: цитоплазма части нейронов гомогенна, лишена тигроида (черная стрелка); сотовидная цитоплазма нейрона (белая стрелка);

- гиперхромные сморщенные нейроны с перичеселлюлярным (зеленая стрелка), периваскулярный отёк (синяя стрелка); большое содержание олигодендроцитов (желтая стрелка), астроциты (красная стрелка), микроглиоциты (розовая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм. С. 60
19. Рисунок 19 – Пирамидные нейроны III слоя СМК мозга крыс: крупноячеистая вакуолизация тел нейронов (черная стрелка); вакуолизация ядер; олигодендроциты (желтая стрелка). Отёчность нейропиля. Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 20 мкм. С. 61
20. Рисунок 20 – Пирамидные нейроны в слоях III (А, Б) и V (В, Г) СМК мозга крыс через 14 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий: очаги «выпадения» нейронов (*) на фоне отёчного нейропиля; гомогенизация цитоплазмы пирамидных нейронов (черные стрелки); острое набухание пирамидной клетки с частичным тигролизом, ядро светлое с премембранозным гиперхроматозом, отек апикального дендрита (белая стрелка); периваскулярный отек (зеленая стрелка); гиперхромные нейроны со сморщиванием (коричневая стрелка); клетки-тени (синяя стрелка); астроциты (красная стрелка), олигодендроциты (желтая стрелка, микроглиоциты (розовая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм. С. 62
21. Рисунок 21 – Пирамидные нейроны слоя V СМК мозга крыс через 14 сут: гиперхромные сморщенные нейроны с неразличимыми контурами ядра (пикноморфные) (черные стрелки), с перинуклеарным отёком (белые стрелки); перичеселлюлярный отёк (коричневая стрелка); пирамидные нейроны с тигролизом и побледнением цитоплазмы, резкое набухание апикального дендрита (синяя стрелка); астроцит (красная стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм. С. 63

22. Рисунок 22 – Слой V СМК мозга крыс через 30 сут после необратимой перевязки общих сонных артерий: очаги «выпадения» нейронов (*); гомогенизация цитоплазмы и ядра, контуры ядра не различимы, рисунок в ядре стерт, ядрышки отсутствуют (белые стрелки); перичеселлюлярный отёк (черная стрелка); резкое набухание тел и апикальных дендритов нейронов (синие стрелки); гиперхромные нейроны со сморщиванием (зеленые стрелки). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм. С. 64
23. Рисунок 23 – Фрагменты слоя III СМК мозга крыс через 30 сут после необратимой перевязки общих сонных артерий: очаги «выпадения» нейронов (*); резкое набухание тел и апикальных дендритов пирамидных нейронов (чёрные стрелки); гомогенизация и побледнение цитоплазмы (белые стрелки); клетки–тени (кариоцитозис) (синие стрелки); периваскулярный отёк (зеленые стрелки); астроциты (красная стрелка), олигодендроциты (желтая стрелка), микроглиоциты (розовая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 40$, шкала – 50 мкм. С. 65
24. Рисунок 24 – Пирамидные нейроны слоя V СМК мозга крыс через 30 сут: гомогенизация ядра и цитоплазмы пирамидного нейрона, контуры ядра нечёткие, цитоплазма бледная (чёрная стрелка); набухание тела нейрона, частичный тигролиз со склеиванием тигроида в основании нейрона (красная стрелка); перичеселлюлярный отёк (белая стрелка); отёк апикального дендрита (жёлтая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм. С. 66
25. Рисунок 25 – Пирамидные нейроны слоя V СМК мозга крыс через 30 сут: кариолизис, цитоплазма гомогенизирована, вакуолизована (черная стрелка); гиперхромный сморщенный нейрон, деформация ядра, ядрышко увеличено (красная стрелка); нечёткий контур ядра, увеличение ядрышка, эксцентричное

- расположение (белая стрелка); набухание тела, ядра и апикального дендрита (жёлтая стрелка). Окраска по методу Ниссля, объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм. С. 67
26. Рисунок 26 – Общая численная плотность нейронов (на мм^2) в слоях III (А) и V (Б) СМК мозга крыс в контрольной группе и после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий на протяжении всего исследуемого срока (1, 3, 7, 14 и 30 сут). С. 70
27. Рисунок 27 – Численная плотность нормохромных нейронов (на мм^2) в слоях III (А) и V (Б) в контрольной группе и после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий на протяжении всего исследуемого срока (1, 3, 7, 14 и 30 сут). С. 71
28. Рисунок 28 – Численная плотность гиперхромных несморщенных и сморщенных нейронов в слое III и V СМК мозга крыс в контроле, через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ПОСА. С. 72
29. Рисунок 29 – Численная плотность гипогромных нейронов (на 1 мм^2) в слое III и V СМК мозга крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий, *Me (QL–QU)*. С. 73
30. Рисунок 30 – Численная плотность астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов в слое III и V СМК мозга крыс в контроле и после необратимой двусторонней ПОСА через 1, 3, 7, 14 и 30 сут. С. 74
31. Рисунок 31 – Численная плотность клеток-теней (на 1 мм^2) в слое III и V СМК мозга крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий, *Me (QL–QU)*. С. 75
32. Рисунок 32 – НГИ в слоях III (а) и V (б) СМК мозга крыс в контроле и после необратимой двусторонней ПОСА. С. 77
33. Рисунок 33 – Слой V СМК мозга крыс при реакции на специфический нейромаркер (NSE): высокая плотность типированного белка в пирамидных нейронах (белые стрелки), низкая плотность (черные стрелки) через 1 сут (а), 3 сут (б), 7 сут (в) и 30 сут (г) после ПОСА. Окраска: NSE, докраска

- гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала – 20 мкм. С. 79
34. Рисунок 34 – Доля (%) NSE–позитивных нейронов в слоях III и V СМК мозга крыс в контроле и после ПОСА. С. 80
35. Рисунок 35 – Нейропиль (*) и нейроны (красные стрелки) слоя I (А), III (Б) и V (В) СМК мозга крыс при реакции на специфический нейрональный белок синаптических терминалей (синаптофизин) различные пространственное распределение и плотность типированного белка (коричневые гранулы). С. 81
36. Рисунок 36 – Нейропиль слоя III СМК мозга крыс через 1(А), 3(Б), 7(В), 14(Г) и 30(Д) сут после ПОСА. Разная плотность р38-позитивных терминалей (стрелки) и мелких вакуолей (светлые округлые). Окраска: синаптофизин, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала – 20 мкм. С. 82
37. Рисунок 37 – Нейроны (красные стрелки), дендриты (черные стрелки) и нейропиль (*) слоя III СМК мозга крыс через 1(А), 3(Б), 7(В), 14(Г) и 30(Д) сут после ПОСА. Разная плотность р38-позитивных терминалей (коричневые частицы) и мелких вакуолей (светлые округлые). Окраска: синаптофизин, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала – 20 мкм. С. 83
38. Рисунок 38 – Синаптические терминали в нейропиле слоя I СМК животных контрольной группы при иммуногистохимическом – синаптофизин (а) и электронномикроскопическом исследовании – осмирование (в). Типирование синаптофизина (а), объектив $\times 100$, шкала 5 мкм; маска (б) изображения (а); осмирование, контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом, шкала 1 мкм. С. 84
39. Рисунок 39 – р38-позитивные синаптические терминали (коричневые и белые стрелки) и их маски (синие и белые стрелки) в слое I СМК животного контрольной группы – синаптофизин. Объектив $\times 100$, ROI – 10×10 мкм. С. 85

40. Рисунок 40 – p38-позитивные синаптические терминалы (коричневые) в слое I СМК животного контрольной группы – синаптофизин. Объектив $\times 100$ С. 86
41. Рисунок 41 – Общая численная плотность p38-позитивных синаптических терминалов в слоях I, III и V СМК животных контрольной группы и после ПОСА. С. 87
42. Рисунок 42 – Относительная площадь p38-позитивных терминалов нейропиля различных слоев сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3). С. 89
43. Рисунок 43 – Синаптические терминалы (А, Б) в нейропиле слоя I (А) и III (Б) СМК через 1 (А) и 3 (Б) сут после ПОСА: различные проявления отека-набухания структур нейропиля, агглютинации и деструкции синаптических пузырьков (красные точки) с умеренным (А) и выраженным (Б) уменьшением их количества в терминалах (стрелки). Окраска: осмирование, контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом, шкала 1 мкм. С. 90
44. Рисунок 44 – p38-позитивные синаптические терминалы (А, стрелки) в слое I СМК через 1 сут после ПОСА – синаптофизин. Точками отмечены яркие крупные терминалы, крестиками – бледные мелкие (Б); с помощью оттенков серого (В) показано более точное типирование терминалов по содержанию белка p38. Объектив $\times 100$; плагин FindFoci. С. 91
45. Рисунок 45 – Методическая основа получение количественных данных (относительная площадь терминалов и мелких очагов отека, %) для нейропиля слоя I СМК мозга крыс с помощью программы ImageJ 1.53. С. 92
46. Рисунок 46 – Относительная площадь p38-позитивных синаптических терминалов и мелких очагов отека-набухания нейропиля различных слоев СМК мозга крыс в норме и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3). С. 94

47. Рисунок 47 – Микроглиоциты через 1 сут после ПОСА: вытянутая форма тел микроглиоцитов. Стрелка – указанные проявления. Окраска: IBA1. Объектив $\times 100$; шкала – 20 мкм. С. 98
48. Рисунок 48 – Слой III СМК (А, Б, В, Г) и слой V СМК (Д) контрольной группы: А – нормохромные нейроны (белые стрелки) и нейропилль (*); Б – равномерное распределение хромогена; протоплазматические (красные стрелки) и волокнистые (желтые стрелки) астроциты. Окраска: гематоксилин-эозином (А); GFAP (Б, В, Г, Д). Объективы $\times 40$ (А, Б), $\times 100$ (В, Г, Д), шкала – 25 мкм. С. 99
49. Рисунок 49 – Слой III СМК: зона пространственного домена одного астроцита (красные стрелки); нейроны (белая стрелка); астроцит и крупные отростки (черная стрелка). Окраска: GFAP. Объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм. С. 100
50. Рисунок 50 – СМК головного мозга крыс через 1 сут после необратимой двусторонней ПОСА: А – скопление волокнистых астроцитов в слое I СМК; Б – протоплазматический астроцит с толстыми отростками в слое III СМК; В – волокнистые астроциты с толстыми первичными отростками слоя V СМК. Стрелки – указанные проявления. Окраска: GFAP. Объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм. С. 101
51. Рисунок 51 – Относительная площадь (%) хромогена при GFAP элементов глиальной сети слоя I, III и V СМК в контроле и после ПОСА. С. 103
52. Рисунок 52 – Слой III СМК (А, Б, В) и слой V СМК (Г, Д, Е) через 3 (А, Г), 7 (Б, Д) и 30 (В, Е) сут после ПОСА. Разная степень гипертрофии отростков астроцитов. Стрелки – указанные проявления. Окраска: GFAP. Объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм. С. 105
53. Рисунок 53 – Фрактальная размерность глиальной сети различных слоев СМК в контроле и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3). С. 106
54. Рисунок 54 – Лакунарность глиальной сети различных слоев СМК

- в контроле и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3). С. 107
55. Рисунок 55 – Волокнистые астроциты слоя III СМК в контроле (А, Б) и через 3 (В, Г) и 30 (Д, Е) сут после ПОСА: А, В, Д – оригинальные изображения, Б, Г, Е – маски изображений. FD (Г) = 1,50, Λ (Г) = 0,83; FD (Д) = 1,56, Λ (Д) = 0,64; FD (Е) = 1,50, Λ (Е) = 0,83. Объектив \times 100, шкала – 25 мкм. С. 108
56. Таблица 1 – Характеристика морфометрических методов исследования. С. 39