

Гидропическая дистрофия сенсомоторной коры белых крыс в контексте формирования темных нейронов и изменения нейроглиальных взаимоотношений после краткосрочной окклюзии общих сонных артерий

Горбунова А.В.¹, Степанов С.С.¹, Акулинин В.А.^{1,2}, Авдеев Д.Б.¹, Шоронова А.Ю.¹, Макарьева Л.М.¹, Конев В.П.¹

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России (Омск)

²ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»

Hydropic degeneration of the sensorimotor cortex of white rats in the context of the formation of dark neurons and changes in neuroglial relationships following short-term common carotid arteries occlusion

Gorbunova A.V.¹, Stepanov S.S.¹, Akulinin V.A.^{1,2}, Avdeev D.B.¹, Shoronova A.Yu.¹, Makaryeva L.M.¹, Konev V.P.¹

¹Omsk State Medical University

²Omsk State Agrarian University n.a. P.A. Stolypin

АННОТАЦИЯ

Введение. Нейродегенеративные процессы являются ключевыми в развитии ряда заболеваний — инсульта, болезни Паркинсона и Альцгеймера, эпилепсия, при черепно-мозговой травме. Они включают в себя первичные и вторичные структурно-функциональные изменения нервной ткани, а также гибель нейронов и полное выпадение функций.

Цель. Изучение проявлений гидропической дистрофии и реорганизации глиоцитоархитектоники в процессе формирования темных нейронов в сенсомоторной коре (СМК) большого мозга половозрелых белых крыс после 40-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА).

Материалы и методы. На белых крысах линии Wistar моделировали 40-минутную ООСА. Головной мозг фиксировали перфузионным способом. Проводили морфометрическую оценку проявлений отека-набухания, цито- и глиоцитоархитектоники СМК в норме ($n = 6$, контрольная группа), на 1-е ($n = 6$), 3-и ($n = 6$) и 7-е сутки ($n = 6$) после ООСА. Использовали окраску по Нисслю, гематоксилином и эозином, иммуногистохимические реакции NSE, MAP-2, GFAP и AIF1. Определяли относительную площадь зон отека-набухания, численную плотность нормохромных и темных пирамидных нейронов, олигодендроцитов (ОДЦ), микроглиоцитов (МГЦ).

Результаты. Высокое содержание (20–50 %) темных нейронов после ООСА сопровождалось увеличением в 3.3 раза относительной площади зон отека-набухания ($r = 0.82$, $p = 0.01$). Специфические белки (NSE, MAP-2) большей части темных нейронов сохранялись. Общая численная плотность нейронов СМК через 7 сут после ООСА уменьшалась на 26.4 % (слой III, $p = 0.001$) и 18.5 % (слой V, $p = 0.01$). Увеличивалось содержание астроцитов, МГЦ и ОДЦ. Пик численной плотности МГЦ отмечен на 1-е сутки, а ОДЦ — на 7-е сутки после острой неполной ишемии ($p \leq 0.001$). Выявленные изменения носили диффузно-очаговый характер.

Заключение. После 40-минутной ООСА в СМК увеличивалось содержание темных нейронов и, как следствие, появлялись признаки гидропической дистрофии. На этом фоне возрастало количество сателлитарных ОДЦ, астроцитов и МГЦ. Вероятно, отек-набухание, активные МГЦ и астроциты предварительно (в 1-е – 3-и сутки) санируют нервную ткань, обеспечивая ее последующее (7-е сутки) структурно-функциональное восстановление с участием ОДЦ.

Ключевые слова: острая ишемия, гидропическая дистрофия, сенсомоторная кора, темные нейроны, астроглия, микроглия, иммуногистохимия, морфометрия, крысы Wistar.

Поступила 30.03.2021
Принята 25.04.2021

Автор, ответственный за переписку
Авдеев Дмитрий Борисович: ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России. 644099, г. Омск, ул. Ленина, 12.
E-mail: avdeev86@inbox.ru

Received 30.03.2021
Accepted 25.04.2021

Corresponding author
Avdeev Dmitry Borisovich: Omsk State Medical University, 12, Lenina str., Omsk, 644099, Russia.
E-mail: avdeev86@inbox.ru

ABSTRACT

Introduction. Neurodegenerative processes are key in the development of a number of diseases — strokes, Parkinson's and Alzheimer's diseases, epilepsy, and traumatic brain injury. They include primary and secondary structural and functional changes in the nervous tissue, as well as the death of neurons and complete loss of functions.

Aim. To study the manifestations of hydropic degeneration and reorganization of glio-cytoarchitectonics during the formation of dark neurons in the sensorimotor cortex (SMC) of the cerebrum of mature white rats in 40 min after the common carotid arteries occlusion (CCAO).

Materials and methods. A 40-minute CCAO was simulated in white Wistar rats. The brain was fixed by perfusion method. Morphometric assessment of manifestations of edema — swelling, cyto- and glio-cyto-architectonics of SMC was performed normally ($n = 6$, control group), on the 1st ($n = 6$), 3rd ($n = 6$) and 7th days ($n = 6$) after CCAO. The Nissl staining, hematoxylin and eosin, immunohistochemical typing NSE, MAP-2, GFAP and AIF1 were applied. The relative area of edema-swelling zones, the numerical density of normochromic and dark pyramidal neurons, oligodendrocytes (OD), microglia (MG) were determined.

Results. The high content (20–50%) of dark neurons after CCAO was accompanied by a 3.3-fold increase in the relative area of edema-swelling zones ($r = 0.82$, $p = 0.01$). Specific proteins (NSE, MAP-2) of most dark neurons were preserved. The total numerical density of SMC neurons decreased by 26.4% (layer III, $p = 0.001$) and 18.5% (layer V, $p = 0.01$) after 7 days of CCAO. The content of astrocytes, MG and OD increased. The peak in the number density of MG was observed in the 1st day, and OD — in the 7th day after acute subtotal ischemia ($p \leq 0.001$). The revealed changes were of a diffuse-focal nature.

Conclusion. After a 40-minute CCAO, the content of dark neurons in SMC increased and, as a result, signs of hydropic degeneration appeared. Against this background, the number of satellite OD, astrocytes and MG increased. Probably, edema-swelling, active MG and astrocytes previously (on the 1st – 3rd day) sanitize the nerve tissue, ensuring its subsequent (on the 7th day) structural and functional recovery with the participation of OD.

Keywords: acute ischemia, hydropic degeneration, sensorimotor cortex, dark neurons, astroglia, microglia, immunohistochemistry, morphometrics, Wistar rats.

ВВЕДЕНИЕ

Нейродегенеративные процессы являются ключевыми в развитии ряда заболеваний — инсульта, болезни Паркинсона и Альцгеймера, эпилепсия, при черепно-мозговой травме. Они включают в себя первичные и вторичные структурно-функциональные изменения нервной ткани, а также гибель нейронов и полное выпадение функций. Механизмы нейродегенеративных процессов интенсивно изучаются [1].

По данным литературы после ишемии в головном мозге выявляются признаки гидропической дистрофии, атрофии, апоптоза, некроза (коликвационного и коагуляционного), фагоцитоза, а также гиперплазии и гипертрофии [2–4]. Эти изменения проявляются отеком-набуханием, вакуолизацией, локальным, субтотальным, тотальным разрушением нуклеопротеинов (гипохромия), уплотнением матрикса, гиперхромией ядра и цитоплазмы без и со сморщиванием, кариорексисом и гомогенизацией клеточных структур (темные нейроны) [5–8]. Имеются данные о том, что образование темных нейронов во всех случаях связано с обратимым однотипным фазовым переходом конформационного состояния белков цитозоля и цитоскелета в живой клетке (по типу гель – гель) [9].

INTRODUCTION

Neurodegenerative processes are key in the development of a number of diseases — strokes, Parkinson's and Alzheimer's diseases, epilepsy, and traumatic brain injury. They include primary and secondary structural and functional changes in the nervous tissue, as well as the death of neurons and complete loss of functions. The mechanisms of neurodegenerative processes are intensively studied [1].

According to the literature, after ischemia in the brain, signs of hydropic dystrophy, atrophy, apoptosis, necrosis (colliquation and coagulation), phagocytosis, as well as hyperplasia and hypertrophy were revealed [2–4]. These changes are manifested by edema-swelling, vacuolization, local, subtotal, total destruction of nucleoproteins (hypochromia), matrix compaction, hyperchromia of the nucleus and cytoplasm with and without shrinking, karyorrhexis and homogenization of cellular structures (dark neurons) [5–8]. There is evidence that the formation of dark neurons in all cases is associated with a reversible phase transition of the conformational state of the cytosol and cytoskeleton proteins in a living cell (by the gel – gel type) [9].

There are reversibly and irreversibly altered degenerative dark neurons in response to pathological effects during the life of the animal. A distinc-

Выделяют обратимо и необратимо измененные дегенеративные темные нейроны в ответ на патологическое воздействие при жизни животного. Отличительной особенностью начальных изменений темных нейронов является гипербазофилия, гипераргирофилия, гиперэлектронная плотность и резкое уплотнение ультраструктурных элементов в перикарионе и дендритах [9–11].

Обратимая прижизненная нейрональная дегенерация проявляется уплотнением перикариона без признаков деструкции его структурных элементов. Проявлениями необратимой прижизненной нейрональной дегенерации (не апоптотные некробиотические изменения) являются «пикноморфный нейрон», «острая эозинофильная дегенерация нейронов», «коагуляционный некроз», которые также называют «красные мертвые нейроны» при окраске фуксином или эозином. Для этих нейронов характерны уменьшение объема перикариона, утрата базофильного вещества, интенсивная эозинофилия цитоплазмы, мелкие и сморщенные темноокрашенные пикнотические ядра, кариорексис. Потенциальную необратимость дегенеративных изменений связывают с степенью гомогенизации ядра и цитоплазмы нейрона [3, 11, 12].

Отличительной особенностью прижизненной дегенерации нейронов может быть вакуолизованный отечный нейропил, в котором произошло набухание нейрональных и астроцитарных отростков. С набуханием дистальных дендритов и формированием «пористого» нейропиля верхних слоев неокортекса связывают ранние ишемические и постишемические функциональные нарушения. Вакуолярные изменения могут наблюдаться также и в цитоплазме темных нейронов. По данным литературы дегенеративно измененные нейроны обычно находятся на разных стадиях патологического процесса — некоторые имеют нормальное ядро, но выраженную эозинофильную цитоплазму, другие — пикнотические или фрагментированные ядра. Кроме того, в зоне появления темных нейронов увеличивается содержание астроцитов и микроглиоцитов [11].

Длительное изучение всех типов темных нейронов показало, что иницирующие их факторы многообразны — различные патобиохимические каскады или физические повреждения, например, ишемия или травма головы. При этом лежащий в основе формирования темных нейронов последующий конформационный переход белков цитозоля трудно предотвратить. Он занимает от 30 до 60 с, сопровождается выделением свободной воды, которая сливается в систему лакун

tive feature of the initial changes in dark neurons is hyperbasophilia, hyperargyrophilia, hyperelectronic density and a sharp compaction of ultrastructural elements in the perikaryon and dendrites [9–11].

Reversible intravital neuronal degeneration is manifested by compaction of the perikaryon without signs of destruction of its structural elements. Manifestations of irreversible intravital neuronal degeneration (non-apoptotic necrobiotic changes) are “pyncnomorphic neuron”, “acute eosinophilic degeneration of neurons”, “coagulation necrosis”, which are also called “red dead neurons” when stained with fuchsin or eosin. These neurons are characterized by a decrease in the volume of the perikaryon, loss of basophilic substance, intense eosinophilia of the cytoplasm, small and wrinkled dark-colored pyncnotic nuclei, and karyorrhexis. The potential irreversibility of degenerative changes is associated with the degree of homogenization of the nucleus and cytoplasm of the neuron [3, 11, 12].

A distinctive feature of intravital neuron degeneration may be a vacuolized edematous neuropile, in which there was a swelling of neuronal and astrocytic processes. Early ischemic and post-ischemic functional disorders are associated with the swelling of distal dendrites and the formation of a “porous” neuropile of the upper layers of the neocortex. Vacuolar changes can also be observed in the cytoplasm of dark neurons. According to the literature, degeneratively altered neurons are usually at different stages of the pathological process — some have a normal nucleus, but a pronounced eosinophilic cytoplasm, others have pyncnotic or fragmented nuclei. In addition, the content of astrocytes and microgliaocytes increases in the area of the appearance of dark neurons [11].

A long-term study of all types of dark neurons has shown that the factors initiating them are diverse — various pathobiochemical cascades or physical damage, for example, ischemia or head injury. At the same time, the subsequent conformational transition of cytosol proteins underlying the formation of dark neurons is difficult to prevent. It takes from 30 to 60 s, is accompanied by the release of free water, which is drained into the lacuna system and squeezed out into astrocytes. This works as a kind of pump that removes unbound water and substances dissolved in it. The more water it pumps, the denser the cytomatrix of the neuron becomes. However, a dehydrated neuron initially has a high potential for recovery. This is due to the fact that all its proteins undergo only conformational changes without hydrolytic breaks of polymers [9].

и выдавливается в астроциты. Это работает как своеобразный насос, удаляющий несвязанную воду и растворенные в ней вещества. Чем больше воды он перекачивает, тем плотнее становится цитоматрикс нейрона. Однако дегидратированный нейрон вначале имеет высокий потенциал для восстановления. Это обусловлено тем, что все его белки подвергаются только конформационным изменениям без гидролитических разрывов полимеров [9].

Таким образом, образование темных нейронов является быстрым обратимым динамичным и самораспространяющимся ответом нервной ткани на переходные изменения во внеклеточной физико-химической среде любой этиологии. После слабых и умеренных воздействий большая часть нейронов не имеет признаков необратимых дегенеративных изменений, т.е. появление большого количества темных нейронов в раннем постишемическом периоде не является признаком их полного разрушения и утилизации в остром и отдаленном периодах [7].

Известно, что полная ишемия вызывает крупноочаговые необратимые некробиотические изменения с вовлечением в процесс воспаления, неполная — диффузно-очаговые, часто обратимые дистрофические изменения без активации провоспалительных цитокинов и микроглии [13–16]. Особенности формирования дегенеративно измененных темных нейронов, а также астроцитарной и микроглиальной реакции в сенсомоторной коре (СМК) головного мозга после 40-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА) не изучены.

В связи с этим представляется актуальным изучение феномена образования темных нейронов в головном мозге животных, в частности, перенесших 40-минутную ООСА.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить проявления гидропической дистрофии и реорганизации глиоцитоматриксной архитектуры в процессе формирования темных нейронов в сенсомоторной коре большого мозга половозрелых белых крыс после 40-минутной окклюзии общих сонных артерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическими комитетами вуза (протокол № 107 от 2 октября 2018 г.). Использовали аутобредных половозрелых крыс стока Wistar (самцы массой 270–350 г). Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, эксперимент

Thus, the formation of dark neurons is a fast reversible dynamic and self-propagating response of the nervous tissue to transient changes in the extracellular physical-chemical environment of any etiology. After mild and moderate effects, most of the neurons have no signs of irreversible degenerative changes, i.e., the appearance of a large number of dark neurons in the early post-ischemic period is not a sign of their complete destruction and disposal in the acute and long-term periods [7].

It is known that total ischemia causes large-focal irreversible necrobiotic changes involving inflammation, subtotal one — diffuse-focal, often reversible dystrophic changes without activation of pro-inflammatory cytokines and microglia [13–16]. The features of the formation of degeneratively altered dark neurons, as well as astrocytic and microglial reactions in the sensorimotor cortex (SMC) of the brain after a 40-minute common carotid arteries occlusion (CCAO) have not been studied.

In this regard, it seems relevant to study the phenomenon of the formation of dark neurons in the brain of animals, in particular, those who underwent a 40-minute CCAO.

AIM OF THE RESEARCH

To study the manifestations of hydroptic degeneration and reorganization of gliocyto-architectonics during the formation of dark neurons in the sensorimotor cortex of the cerebrum of mature white rats after 40-minute occlusion of the common carotid arteries.

MATERIALS AND METHODS

The work was carried out at the Omsk State Medical University, approved by the ethical committees of the university (Protocol No. 107 of October 2, 2018). Outbred mature Wistar rats (males weighing 270–350 g) were used. The animals were kept in standard laboratory conditions, the experiment was carried out in accordance with the recommendations of the International Committee on Laboratory Animals, supported by WHO, Directive of the European Parliament No. 2010/63/EU of 22.09.2010 “On the Protection of Animals Used for Scientific Purposes.”

Acute subtotal transient cerebral ischemia during 40 min was modeled by occlusion of the common carotid arteries without hypotension. The choice of this model was due to the fact that, unlike focal total ischemia (for example, occlusion of the middle cerebral artery), this model did not lead to large-focal necrotic changes [14–16]. The experiment was performed under anesthesia: zoletil 100 (10 mg/kg of

проводили в соответствии с рекомендациями Международного комитета по лабораторным животным, поддержанными ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей».

Острую неполную транзиторную ишемию головного мозга длительностью 40 мин моделировали путем окклюзии общих сонных артерий без гипотонии. Выбор этой модели был обусловлен тем, что, в отличие от фокальной полной ишемии (например, окклюзия средней мозговой артерии), данная модель не приводила к крупноочаговым некротическим изменениям [14–16]. Эксперимент проводили под наркозом: золетил 100 (10 мг/кг массы тела). На 1-е, 3-и и 7-е сутки после ООСА ($n = 18$, по 6 крыс на каждый указанный срок) сосудистое русло мозга промывали введением 100–125 мл раствора 0.9% NaCl и фрагмина (5000 ME) в левый желудочек сердца и фиксировали перфузией 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7.2–7.4). Подобный подход широко используется при заборе материала [8]. Контролем служили интактные крысы ($n = 6$). Полученный материал заключали (автоматический процессор STP 120) в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы (толщина 4 мкм) готовили (микротом HM 450, Thermo Scientific) на уровне сенсомоторной коры [17]. Манипуляции, связанные с забором материала, проводили под наркозом (золетил 100).

Идентификацию клеток (пирамидные нейроны/глия) СМК проводили на светооптических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и по Нисслю, а также при иммуногистохимическом типировании белков NSE, MAP-2 (нейроны), GFAP (астроциты) и AIF-1 (микроглия). Численную плотность пирамидных нейронов, астроцитов и олигодендроцитов (ОДЦ) определяли при окраске по Нисслю, а микроглиоцитов (МГЦ) — при типировании AIF-1. Состояние цитоскелета нейронов (тела и дендриты) изучали с помощью специфических реакций на MAP-2, а цитоскелета астроцитов — реакции на GFAP промежуточных филаментов. Микроглиоциты верифицировали с помощью специфической для этих клеток реакции на AIF-1 (аллотрансплантат воспалительного фактора 1).

Для иммуногистохимического исследования использовали поли- и моноклональные антитела к белкам NSE, MAP-2, GFAP и AIF-1: NSE — кроличьи поликлональные антитела к крысиному антигену, разведение 5–20 мкг/мл (Cloud-Clone

body weight). On the 1st, 3rd and 7th days after CCAO ($n = 18$, 6 rats for each specified period), the cerebral vascular bed was washed by injecting 100–125 ml of 0.9% NaCl and fragmin solution (5000 IU) into the left ventricle of the heart and fixed by perfusion of 30 ml of 4% paraformaldehyde solution on a phosphate buffer (pH 7.2–7.4). Such an approach is widely used when taking material [8]. The control was intact rats ($n = 6$). The obtained material was enclosed (automatic tissue processor STP 120) in homogenized paraffin (HISTOMIX®). Serial frontal sections (thickness 4 μm) were prepared (microtome HM 450, Thermo Scientific) at the level of the sensorimotor cortex [17]. Manipulations related to the taking of material were performed under anesthesia (zoletil 100).

The identification of cells (pyramidal neurons/glia) of SMC was carried out on light-optical preparations stained with hematoxylin and eosin and by Nissl, as well as by immunohistochemical typing of proteins NSE, MAP-2 (neurons), GFAP (astrocytes) and AIF-1 (microglia). The numerical density of pyramidal neurons, astrocytes and oligodendrocytes (OD) was determined by Nissl staining, and microglia (MG) were determined by AIF-1 typing. The state of the cytoskeleton of neurons (bodies and dendrites) was studied using specific reactions to MAP-2, and the cytoskeleton of astrocytes — reactions to GFAP of intermediate filaments. Microglia were verified by a cell-specific reaction to AIF-1 (allograft inflammatory factor-1).

For the immunohistochemistry, poly- and monoclonal antibodies to the proteins NSE, MAP-2, GFAP and AIF-1 were used: NSE — rabbit polyclonal antibodies to rat antigen, dilution of 5–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Cloud-Clone Corp.); MAP-2 — rabbit polyclonal antibodies, dilution of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ab32454, Abcam, USA); GFAP — mouse monoclonal antibodies, GA5 clone, ready-for-use (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK); AIF-1 — rabbit polyclonal antibodies, dilution of 5–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Cloud-Clone Corp.). The immunohistochemical reaction was performed using the Novolink Polymer Detection System kit (Leica Biosystems Newcastle Ltd, the UK), the specimens were finished with hematoxylin, enclosed in polystyrene.

To count the cells in each animal, five periodic Nissl-colored frontal sections of SMC were used. The specimens were photographed using a Leica DM1000 microscope (lens $\times 10$, 40, 100, GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1.4 \times 1.4 μm), the image was saved in files with the TIFF extension (2592 \times 1944 pixels). We per-

Corp.); MAP-2 — кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (ab32454, Abcam, США); GFAP — мышинные моноклональные антитела, клон GA5, готовые к применению (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания); AIF-1 — кроличьи поликлональные антитела, разведение 5–20 мкг/мл (Cloud-Clone Corp.). Иммуногистохимическую реакцию проводили на срезах, помещенных на полилизиновые предметные стекла. Визуализацию белков проводили с помощью мультимерного набора Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания), препараты докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол.

Для подсчета клеток у каждого животного использовали по пять периодических окрашенных по Нисслию фронтальных срезов СМК. Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM1000 (объектив $\times 10$, 40, 100, камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, размер пикселя 1.4×1.4 мкм), изображение сохраняли в файлах с расширением TIFF (2592×1944 пикселей). Проводили стандартную коррекцию с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость) в Photoshop CC. Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.53e. Вариационные ряды формировались путем рандомизации случайным образом отобранных цветных изображений СМК — 8–10 областей с каждого среза. Формирование окончательных выборок полей зрения для каждого срока (1-е, 3-е и 7-е сутки) ($n = 25$, на каждый 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 СМК. Общую численную плотность пирамидных нейронов, астроцитов и олигодендроцитов в СМК определяли при окраске по Нисслию и гематоксилином и эозином. Идентификацию нейронов проводили по наличию ядрышек на срезах перикарионов (пересчет на 1 мм^2), которые, согласно [5], являются чрезвычайно устойчивой структурой нейрона. Определяли содержание (%) нормо- и гиперхромных нейронов (темных несморщенных и пикноморфных). Для морфометрического анализа также использовали иммуногистохимическую реакцию на AIF-1 (численная плотность микроглиоцитов) и GFAP (численная плотность астроцитов). Реакции (NSE, MAP-2) применяли для идентификации нейронов по специфическим белкам.

formed a standard correction using the Camera Raw filter (contrast, white balance, clarity) in Photoshop CC. Further morphometric research was carried out using the ImageJ 1.53e program. Variation series were formed by randomization of randomly selected color images of SMC — 8–10 regions from each section. The formation of the final samples of visual fields for each period (1st, 3rd and 7th days) ($n = 25$, for each period) was carried out from the obtained data arrays using a random number generator in the Statistica 8.0 program. Thus, 25 randomly selected visual fields of SMC were selected for morphometric analysis for the period. The total numerical density of pyramidal neurons, astrocytes and oligodendrocytes in SMC was determined by Nissl staining and hematoxylin and eosin. The identification of neurons was carried out by the presence of nucleoli on the sections of perikaryons (recalculated by 1 mm^2), which, according to [5], are an extremely stable structure of a neuron. The content (%) of normal and hyperchromic neurons (dark, non-shrunken and pycnomorphic) was determined. For morphometric analysis, an immunohistochemical reaction to AIF-1 (numerical density of microgliaocytes) and GFAP (numerical density of astrocytes) was also used. The reactions (NSE, MAP-2) were used to identify neurons by specific proteins.

The detection of edema-swelling zones (maximum pixel brightness — Maxima) of the nervous tissue was carried out using the Find Maxima M. Schmid filter from the ImageJ 1.53 e program (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). For each period (1st, 3rd and 7th days), 50 randomly selected visual fields (lens $\times 100$) were used. The percent area of the maximum brightness zones was determined using the image masks obtained as a result of the operation of this filter (the Analyze Particles tool).

According to the literature data in neuromorphology, 6–8 animals in a group, 5–6 serial sections and 5–10 random visual fields of SMC on each section are sufficient to obtain significant results [8, 18]. In this study, we compared 25 randomized visual fields for each term.

Statistical hypotheses were tested using non-parametric criteria. Initially, the criterion for multiple comparison (ANOVA Kruskal-Wallis) was used. When obtaining a statistically significant result, a pair comparison was performed using the Mann-Whitney U-test for independent samples. The criteria of χ^2 and Fischer were also used. The quantitative data in the study are presented as the median (Me —

Выявление зон отека-набухания (максимальная яркость пикселей — Maxima) нервной ткани проводили с помощью плагин-фильтра Find Maxima M. Schmid из программы ImageJ 1.53e (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). Для каждого срока (1-е, 3-и и 7-е сутки) использовали по 50 случайно выбранных полей зрения (объектив $\times 100$). На полученных в результате работы этого фильтра масках изображений определяли (инструмент Analyze Particles) относительную площадь зон максимальной яркости.

Согласно литературным данным в нейроморфологии для получения достоверных результатов достаточно 6–8 животных в группе, 5–6 серийных срезов и 5–10 случайных полей зрения СМК на каждом срезе [8, 18]. В настоящем исследовании мы сравнивали по 25 рандомизированных полей зрения на каждый срок.

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями. Первоначально использовали критерий для множественного сравнения (ANOVA Kraskel-Wallis). При получении статистически значимого результата проводили парное сравнение с помощью Mann-Whitney U-test для независимых выборок. Использовались также критерии χ^2 и Фишера. Количественные данные в исследовании представлены как медиана (*Me* — 50% квартиль) и интерквартильный разброс ($Q1-Q3$ — 25–75% квартили), а также как проценты. Нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0.05$. Анализ проведен с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft) [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После ООСА в СМК отмечали признаки вакуолизации дендритов и отростков астроглии нейропиля, реже — перикарионов (рис. 1). Если у животных контрольной группы степень гидратации нервной ткани СМК, определенная по относительной площади зон отека-набухания (ОПОН), составила 5.4 % (2.8–7.9 %) поля зрения, то через 1 сут после ООСА этот показатель увеличился в 3.3 раза и сохранялся на высоком уровне на 3-и и 7-е сутки (рис. 2). Основной объем зон отека-набухания был связан с нейропилем (дендриты, синапсы, отростки астроцитов) и микрососудами (отростки астроцитов) (рис. 1, А, В). Только для единичных нейронов отмечены проявления перичеселлюлярного отека. Это свидетельствовало о том, что свободная вода, образовавшаяся при формировании темных нейронов, скапливалась в дистальных дендритах, мелких отростках астроцитов нейропиля и, вероятно, депонировалась в периваскулярных ножках.

50% quartile) and interquartile spread ($Q1-Q3$ — 25–75% quartile), as well as as percentages. The null hypothesis was rejected at $p < 0.05$. The analysis was carried out using the Statistica 8.0 program (StatSoft) [19].

RESULTS AND DISCUSSION

After CCAO, signs of vacuolization of dendrites and processes of astroglia of the neuropile were noted in the sensorimotor cortex, less often — perikaryons (Fig. 1). If in the animals of the control group the degree of hydration of the nervous tissue of SMC, determined by the percent area of the edema-swelling zones (PAES), was 5.4% (2.8–7.9%) of the visual field, then 1 day after CCAO, this indicator increased by 3.3 times and remained at a high level on the 3rd and 7th days (Fig. 2). The main volume of the edema-swelling zones was associated with the neuropil (dendrites, synapses, astrocyte processes) and microvessels (astrocyte processes) (Fig. 1, A, B). Only for single neurons, manifestations of pericellular edema were noted. This indicated that the free water formed during the formation of dark neurons accumulated in the distal dendrites, small processes of neuropil astrocytes and, probably, was deposited in the perivascular stalks.

In 40 min after CCAO, a large number of dark neurons were detected (Fig. 1, A, C, D). On the 1st day after CCAO reversibly altered dark neurons prevailed without signs of gross destruction of the nucleus and cytoplasm, with a preserved nucleolus, a moderate decrease in perikaryon volume — as the result of conformational changes in cytomatrix proteins. Irreversible invital degeneration of neurons was manifested by a pronounced decrease in the volume of the perikaryon, intense eosinophilia of the nucleus and cytoplasm, loss of basophilic substance, the appearance of neurons with wrinkled dark-colored pycnotic nuclei and the disappearance of the contours of the nucleus, i.e., signs of protein dystrophy and transition to coagulation necrosis (Fig. 1, C, D). The highest content of all types of dark neurons was noted on the 3rd and 7th days after CCAO in layer V (see Fig. 2). The proportion of pycnomorphic neurons (the number of pycnomorphic neurons out of 200 studied for each period) in the acute period (1st–3rd day) was less than after 7 days: in the acute period in layer III — 8/200, layer V — 13/200, and on the 7th day — 19/200 ($\chi^2 = 3.9$; $df = 1$; $p = 0.046$) and 28/200 ($\chi^2 = 5.3$; $df = 1$; $p = 0.021$) respectively.

According to the data of paired correlation analysis (Spearman) after CCAO, a relationship was revealed between the content of dark neurons in the visual field and the percent area of edema-swelling

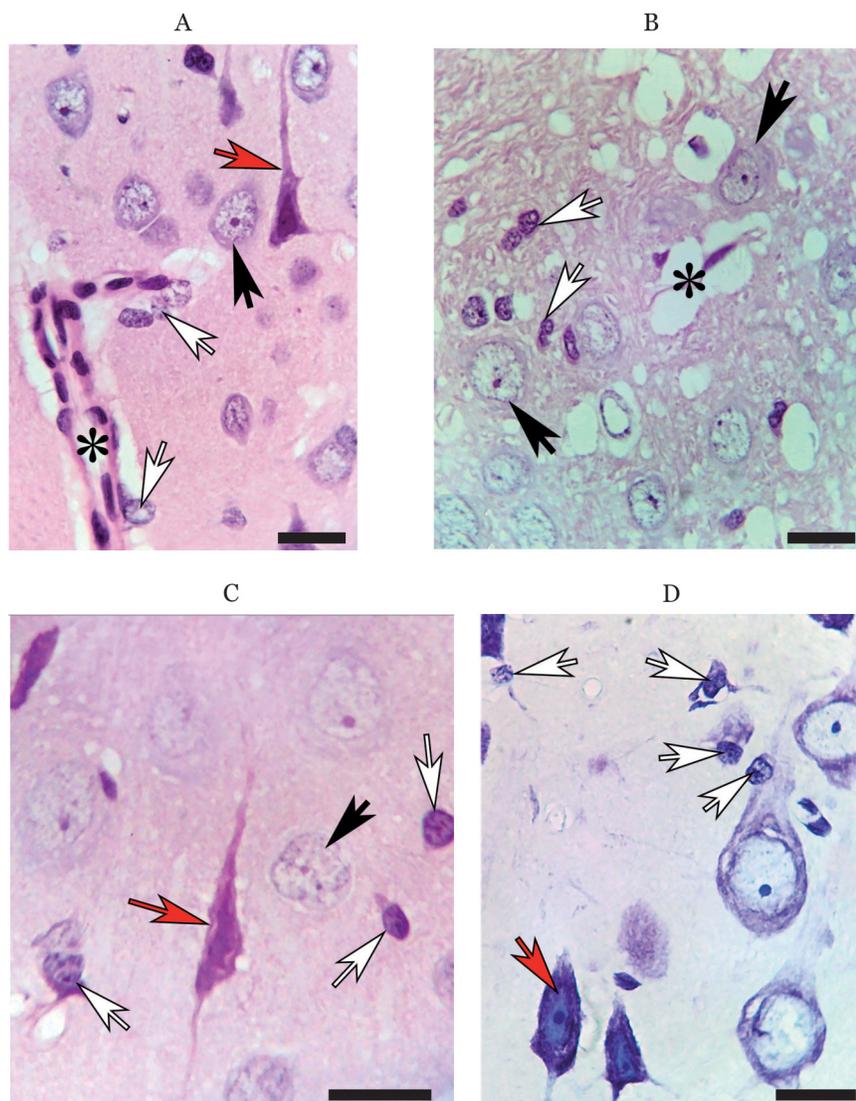


Рис. 1. Пирамидные нейроны слоев III (А, В) и V (С, D) СМК головного мозга на 1-е (А, В) и 7-е (С, D) сутки после ООСА: темные (гиперхромные) нейроны (красные стрелки) рядом с нормохромными нейронами (черные стрелки), большое количество глиальных клеток (белые стрелки), вакуолизация нейропиля (D); знаком * обозначены микрососуды с перичеллюлярным отеком. Окраска гематоксилином и эозином (А, В, С), по Нисслю (D). Объектив: $\times 100$; шкала — 20 мкм

Fig. 1. Pyramidal neurons of layers III (A, B) and V (C, D) of SMC of the brain on the 1st (A, B) and 7th (C, D) days after CCAO: dark (hyperchromic) neurons (red arrows) next to normochromic neurons (black arrows), a large number of glial cells (white arrows), vacuolization of the neuropile (D); the sign * indicates microvessels with pericellular edema. Staining with hematoxylin and eosin (A, B, C), Nissl (D). Lens: $\times 100$; scale — 20 μm

После 40-минутной ООСА выявлялось большое количество темных нейронов (рис. 1, А, С, D). В 1-е сутки после ООСА преобладали обратимо измененные темные нейроны без признаков грубой деструкции ядра и цитоплазмы, с сохраненным ядрышком, умеренным уменьшением объема перикариона — результат конформационных изменений белков цитоматрикса. Необратимая прижизненная дегенерация нейронов проявлялась выраженным уменьшением объема перикариона, интенсивной эозинофилией ядра и цито-

zones. A strong positive correlation observed for 1st ($r = 0.72$; $p = 0.03$) and 3rd ($r = 0.82$; $p = 0.01$) day, the average — on the 7th day after CCAO ($r = 0.65$; $p = 0.02$).

Thus, after CCAO quickly died and eliminated the small pyramidal neurons of layer III, and large pycnomorphic neurons of layer V was accumulated. Their disposal required more time (> 7 days) and resources (microgliaocytes, astrocytes) [20].

In non-shrunken (Fig. 3, A, B) and shrunken (Fig. 3, C, D) dark neurons, high immunoreactivity of

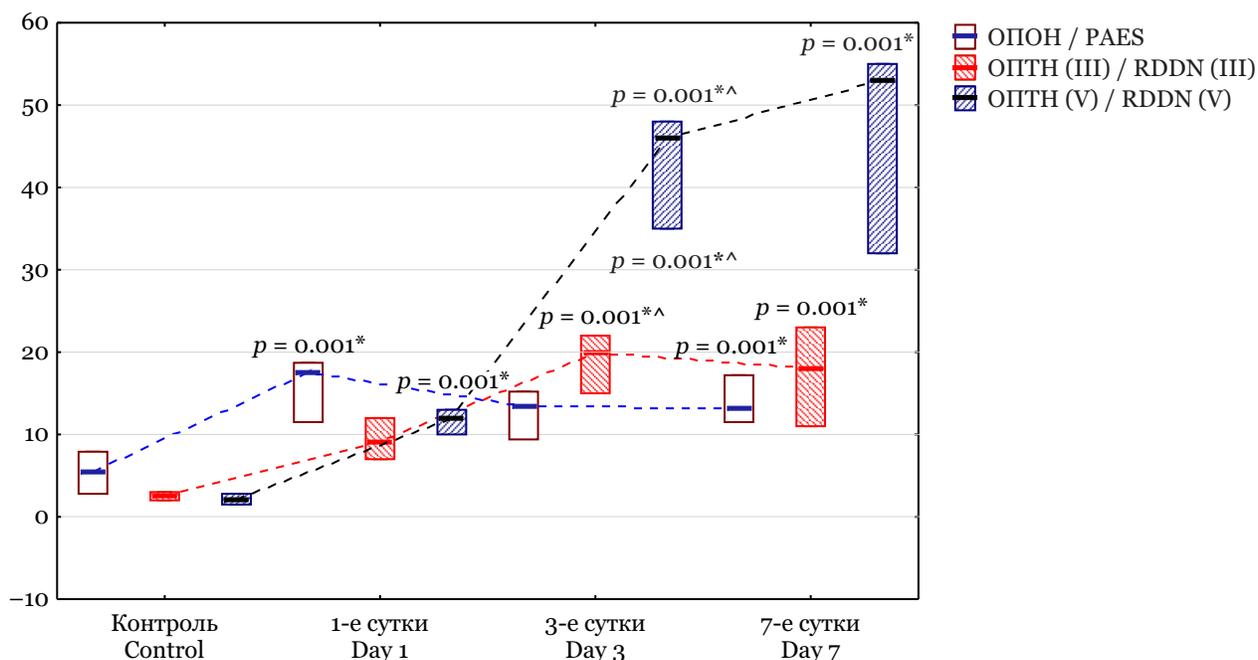


Рис. 2. Относительная площадь зон отека-набухания (ОПОН, %) , относительная плотность темных нейронов (ОПТН, %) в III и V слоях СМК в группе контроля и после 40-минутной ООСА. Различия статистически значимы по сравнению с группой контроля (*) и предыдущим сроком (^) при $p < 0.001$. Данные представлены как медиана, нижний и верхний квартили (интерквартильный размах)

Fig. 2. Percent area of edema-swelling zones (PAES, %), relative density of dark neurons (RDDN, %) in layers III and V of SMS in the control group and after 40-minute CCAO. The differences are statistically significant compared to the control group (*) and the previous period (^) at $p < 0.001$. The data are presented as median, lower and upper quartiles (interquartile range)

плазмы, утратой базофильного вещества, появлением нейронов со сморщенными темноокрашенными пикнотическими ядрами и исчезновением контуров ядра, т.е. признаками белковой дистрофии и перехода в коагуляционный некроз (рис. 1, С, D). Максимально высокое содержание всех типов темных нейронов отмечали на 3-и и 7-е сутки после ООСА в слое V (см. рис. 2). Доля пикноморфных нейронов (количество пикноморфных нейронов из 200 изученных для каждого срока) в остром периоде (1-е – 3-и сутки) была меньше, чем через 7 сут: в остром периоде в слое III – 8/200, слое V – 13/200, а на 7-е сутки – 19/200 ($\chi^2 = 3.9$; $df = 1$; $p = 0.046$) и 28/200 ($\chi^2 = 5.3$; $df = 1$; $p = 0.021$) соответственно.

По данным парного корреляционного анализа (Спирмен) после ООСА выявлена связь между содержанием в поле зрения темных нейронов и относительной площадью зон отека-набухания. Сильная положительная связь отмечена на 1-е ($r = 0.72$; $p = 0.03$) и 3-и ($r = 0.82$; $p = 0.01$) сутки, средняя – на 7-е сутки после ООСА ($r = 0.65$; $p = 0.02$).

Таким образом, после ООСА быстрее погибали и элиминировались мелкие пирамидные нейроны слоя III, а крупные пикноморфные нейроны слоя V накапливались. Для их утилизации

specific NSE and MAP-2 proteins was preserved. Probably, the compaction of cytomatrix neurofilaments (MAP-2) without destruction of microtubules and even the appearance of small vacuoles (Fig. 3, C) is not the cause of neuronal death, but only indicates their preservation as a result of conformational dehydrating changes in the cytomatrix. As a result, the physicochemical bases of the formation and propagation of a nerve impulse, as well as neuroplastic mechanisms, are blocked, but the cell does not die. At the same time, the high density of NSE ensures that a certain critical level of ATP is achieved anaerobically to support the basic needs of the dark cell. As a result, most of the dark neurons are restored after a 40-minute CCAO. This is supported by the literature data [18].

The structural changes of neurons described above were accompanied by a reorganization of the neuroglial architectonics. The population of astrocytes, oligodendrocytes and microglia changed (Fig. 1, D and 4). The neuroastrocyte index increased from 1.62 (1.53–1.81) in the control group to 2.72 (2.48–3.10) in the group after CCAO ($p = 0.001$). In parallel, hypertrophy of astrocyte processes was noted (Fig. 4, B, C, D). However, it is necessary to focus attention on the fact that on the 1st

требовались больше времени (> 7 сут) и материальных ресурсов (МГЦ, астроциты) [20].

В несморщенных (рис. 3, А, В) и сморщенных (рис. 3, С, D) темных нейронах сохранялась высокая иммунореактивность специфических белков NSE и MAP-2. Вероятно, уплотнение нейрофиламентов цитоматрикса (MAP-2) без разрушения микротрубочек и даже появление мелких вакуолей (рис. 3, В) не является причиной гибели нейронов, а свидетельствует лишь об их консервации в результате конформационных дегидратирующих изменений цитоматрикса. В результате блокируются физико-химические основы образования и распространения нервного импульса, а также нейропластические механизмы, но клетка не погибает. При этом высокая плотность NSE обеспечивает достижение определенного критического уровня АТФ анаэробным путем для поддержки базовых потребностей темной клетки. В результате большая часть темных нейронов после 40-минутной ООСА восстанавливается. В пользу этого свидетельствуют и литературные данные [18].

Описанные выше структурные изменения нейронов сопровождались реорганизацией нейроглиальной архитектоники. Изменялась популяция астроцитов, олигодендроглиоцитов и микроглиоцитов (рис. 1, D и 4). Нейроастроцитарный индекс увеличивался с 1.62 (1.53–1.81) в группе контроля до 2.72 (2.48–3.10) в группе после ООСА ($p = 0.001$). Параллельно с этим отме-

day after CCAO, a large number of small vacuoles and destruction of part of the astrocyte cytoskeleton were detected in the astrocyte processes (Fig. 4, A). Hypertrophic hyperplastic manifestations of reactive astrogliosis were noted later — on the 3rd and 7th days after ischemia. A large number of fibrous and protoplasmic astrocytes with powerful primary processes appeared, as well as zones of high astrocyte density (Fig. 4, B, C, D). On the 7th day after CCAO, an increase in the number of fibrous astrocytes was noted in the subpial zone under the outer border glial membrane of the brain. Earlier, after a 20-minute CCAO, we revealed quantitative heterogeneity and heterochrony of changes in the spatial organization of the proximal and distal branches of astrocytic processes. Small processes of astrocytes located on the periphery of their domains were more labile and reactive [21]. In our studies, a small-focal increase in the number of reactive fibrous astrocytes did not allow us to talk about pathological astrogliosis after irreversible destruction of neurons, characteristic of ischemic and hemorrhagic stroke. Such changes in astrocytes rather indicated the activation of their natural protective functions aimed at recovery and disposal of damaged neurons.

In the brains of control animals, small — 21.2 μm (30.8–42.6 μm) — inactive microgliaocytes with long processes prevailed. After CCAO, large amoeboid MG appeared — 42.6 μm^2 (31.3–51.0 μm^2) ($p = 0.0001$). This probably indicated the activation

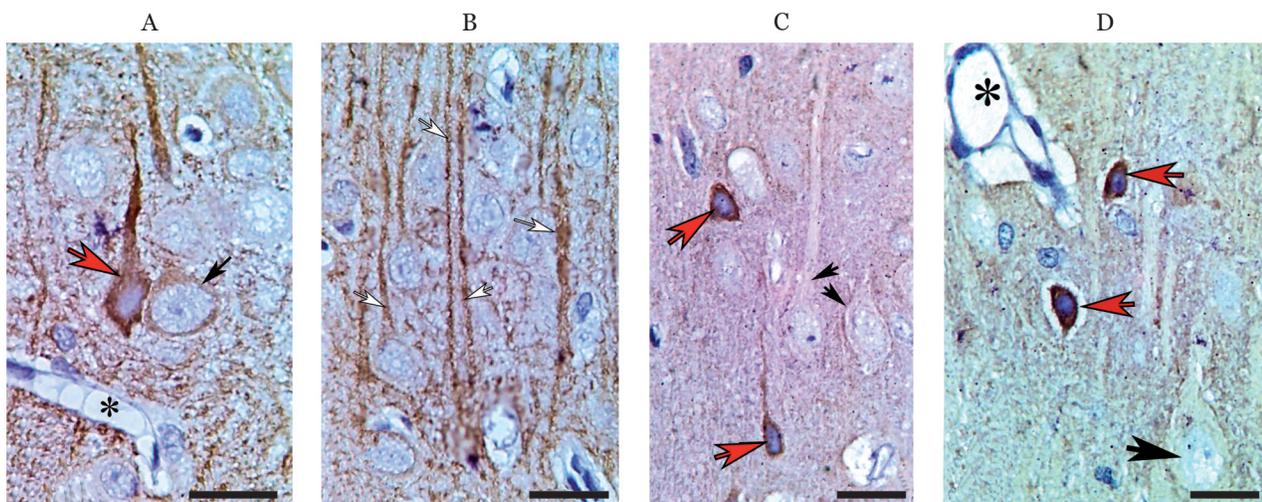


Рис. 3. Темные нейроны при реакции на специфические нейрональные белки: сохранность и высокая плотность типированных белков: А, В — MAP-2 (1-е сутки); С, D — NSE (3-и сутки). Белые стрелки — дендриты, красные стрелки — темные нейроны, черные стрелки — нормохромные нейроны, знаком * обозначены микрососуды с проявлениями отека-набухания периваскулярных отростков астроцитов.

Имуногистохимическое исследование. Объектив: $\times 100$; шкала — 20 μm

Fig. 3. Dark neurons in response to specific neuronal proteins: safety and high density of typed proteins: А, В — MAP-2 (day 1); С, D — NSE (day 3). White arrows — dendrites, red arrows — dark neurons, black arrows — normochromic neurons, the sign * indicates microvessels with manifestations of edema-swelling of perivascular processes of astrocytes.

Immunohistochemistry. Lens: $\times 100$; scale — 20 μm

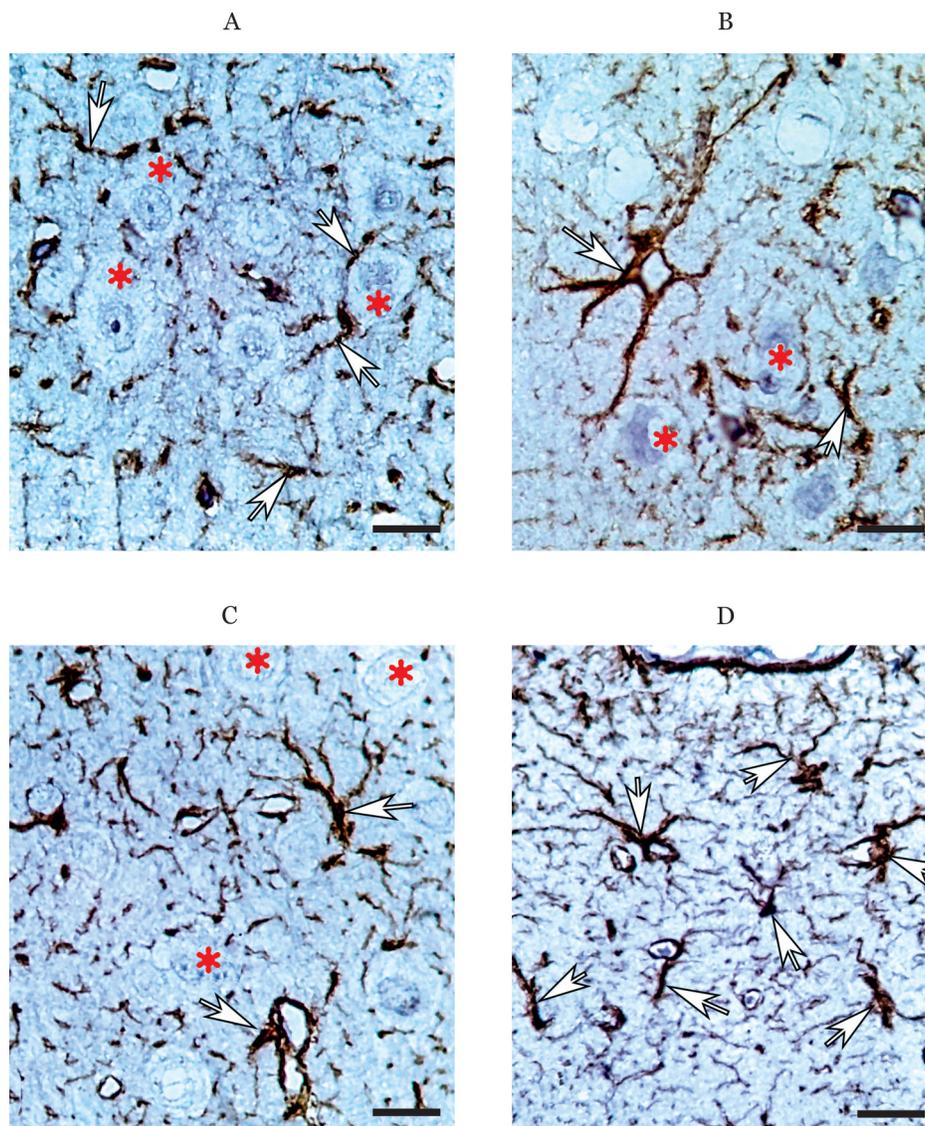


Рис. 4. Астроциты (показаны стрелками) слоев III (А, В, С) и I СМК головного мозга на 1-е (А), 3-и (В) и 7-е (С, D) сутки после ООСА: вакуолизация астроцитов, фрагментация GFAP-позитивного материала цитоскелета (А), гипертрофия астроцита (В, С), высокая плотность астроцитов (D). Знаком * обозначены нейроны.

Иммуногистохимическое исследование GFAP. Объектив: $\times 100$; шкала — 20 мкм

Fig. 4. Astrocytes (shown by arrows) of layers III (A, B, C) and I of SMC of the brain on the 1st (A), 3rd (B) and 7th (C, D) days after CCAO: vacuolization of astrocytes, fragmentation of GFAP-positive material of the cytoskeleton (A), astrocyte hypertrophy (B, C), high density of astrocytes (D). The sign * indicates neurons. Immunohistochemistry of GFAP.

Lens: $\times 100$; scale — 20 μm

чалась гипертрофия отростков астроцитов (рис. 4, В, С, D). Однако необходимо акцентировать внимание на том, что на 1-е сутки после ООСА в отростках астроцитов выявлено большое количество мелких вакуолей и разрушение части цитоскелета астроцитов (рис. 4, А). Гипертрофические гиперпластические проявления реактивного астроглиоза отмечались позже — на 3-и и 7-е сутки после ишемии. Появлялось большое количество фиброзных и плазматических астроцитов с мощными первичными отростками, а также

of neuroinflammation and phagocytic activity of microglia [22].

A comparison of the dynamics of changes in the number of MG and OD in SMC showed that the peak of the increase in the density of these cells after CCAO was different: for MG — the 1st day, for OD — the 7th day (Fig. 5). This indicated that at first there was a wave of activation of microglial cells (“scavengers”), as a result, in the acute post-ischemic period, detection of degenerating neurons and sanitation of nerve tissue occurred, providing phagocytosis of all

зоны высокой плотности астроцитов (рис. 4, В, С, D). На 7-е сутки после ООСА отмечено увеличение количества фиброзных астроцитов в субпильной зоне под наружной пограничной глиальной мембраной мозга.

Ранее нами после 20-минутной ООСА выявлена количественная гетерогенность и гетерохронность изменений пространственной организации проксимальных и дистальных ветвей астроцитарных отростков. Более лабильными и реактивными были мелкие отростки астроцитов, расположенные по периферии их доменов [21]. В наших исследованиях мелкоочаговое увеличение количества реактивных фиброзных астроцитов не позволяло говорить о патологическом астроглиозе после необратимого разрушения нейронов, свойственного для ишемического и геморрагического инсульта. Подобные изменения астроцитов скорее свидетельствовали об активации их естественных защитных функций, направленных на восстановление и утилизацию поврежденных нейронов.

В мозге контрольных животных преобладали мелкие — 21.2 мкм² (30.8–42.6 мкм²) — неактивные микроглиоциты с длинными отростками. После ООСА появлялись крупные амебоидные МГЦ — 42.6 мкм² (31.3–51.0 мкм²) ($p = 0.0001$). Вероятно, это свидетельствовало об активации нейровоспаления и фагоцитарной активности МГЦ [22].

Сравнение динамики изменения количества МГЦ и ОДЦ в СМК показало, что пик увеличения плотности этих клеток после ООСА отличался: для МГЦ — 1-е сутки, для ОДЦ — 7-е сутки (рис. 5). Это свидетельствовало о том, что сначала проходила волна активации микроглиальных клеток («мусорщиков»), в результате в остром постишемическом периоде осуществлялась детекция дегенерирующих нейронов и санация нервной ткани, обеспечивающая фагоцитоз всех необратимо измененных клеток и молекул. Это приводило к удалению части поврежденных нейронов (см. рис. 5). Через 7 сут в слое III дефицит нейронов составил 26.4 % ($p = 0.001$) и 18.5 % ($p = 0.01$) в слое V. Далее на этом фоне, вероятно, включались механизмы нейропластичности, для обеспечения которых активировались ОДЦ, обладающие высоким нейротрофическим потенциалом. Таким образом, необратимому разрушению подвергалась только часть темных нейронов, адаптивный потенциал которых, вероятно, был исчерпан в постишемическом периоде.

Проведенное исследование показало, что неполная острая ишемия (40-минутная ООСА) приводит к диффузно-очаговым изменениям нервной ткани головного мозга (проявления отека-

irreversibly altered cells and molecules. This led to the removal of some of the damaged neurons (see Fig. 5). After 7 days, the neuronal deficit in layer III was 26.4% ($p = 0.001$) and 18.5 % ($p = 0.01$) in layer V. Further, against this background, neuroplasticity mechanisms were probably included, for which oligodendrocytes with high neurotrophic potential were activated. Thus, only a part of dark neurons, whose adaptive potential was probably exhausted in the post-ischemic period, underwent irreversible destruction.

The study showed that subtotal acute ischemia (40-minute CCAO) leads to diffuse-focal changes in the nervous tissue of the brain (manifestations of edema-swelling, hyperchromic tinctorial changes, reactive astrogliosis, an increase in the number of microgliaocytes), which are primarily advisable to consider in the context of activation of the mechanisms of natural defense of neurons. It is known that the formation of dark neurons in response to energy deficiency, an increase in the number of hydrogen ions (H⁺) and free calcium (Ca⁺⁺) can be associated with conformational changes in cytomatrix proteins. As a result, a large amount of unbound water is formed, which is squeezed out into the processes of astrocytes [3, 9, 10]. We believe that with this flow, ischemic toxins and ions dissolved in water are removed from dark neurons. The logical chain of events related to the dark neuron is viewed: 1) dehydration-detoxification; 2) preservation of the neuron state without destroying its cytomatrix; 3) restorative hydration; 4) normal functioning. At all stages of this chain, the key role is played by neuroglial cells that regulate the water flow (astrocytes), control the degree of damage and disposal of neurons (MG), provide it with trophic factors (astrocytes, OD, MG) for the implementation of neuroplasticity mechanisms.

Thus, after a 40-minute CCAO with the participation of neurons, OD, different phenotypes of astrocytes and microgliaocytes, complex cellular systems are formed, which we consider in the aspect of cell-cell phagocytic and trophic relationships, taking into account the spatiotemporal features of the main process (damage, recovery). In this direction, it is promising to study the activation and functioning of different phenotypes and morphotypes of glial cells. According to the literature data, MG migrate and absorb soma and apical dendrites after activation, astrocytes phagocytise numerous small dendritic apoptotic bodies, OD provide subsequent restoration of axons. All together, they enhance the synthesis of neurotrophic factors and regulate the reparative reorganization of the nervous tissue as a whole [16, 20, 23]. The phenomenon of structural and functional

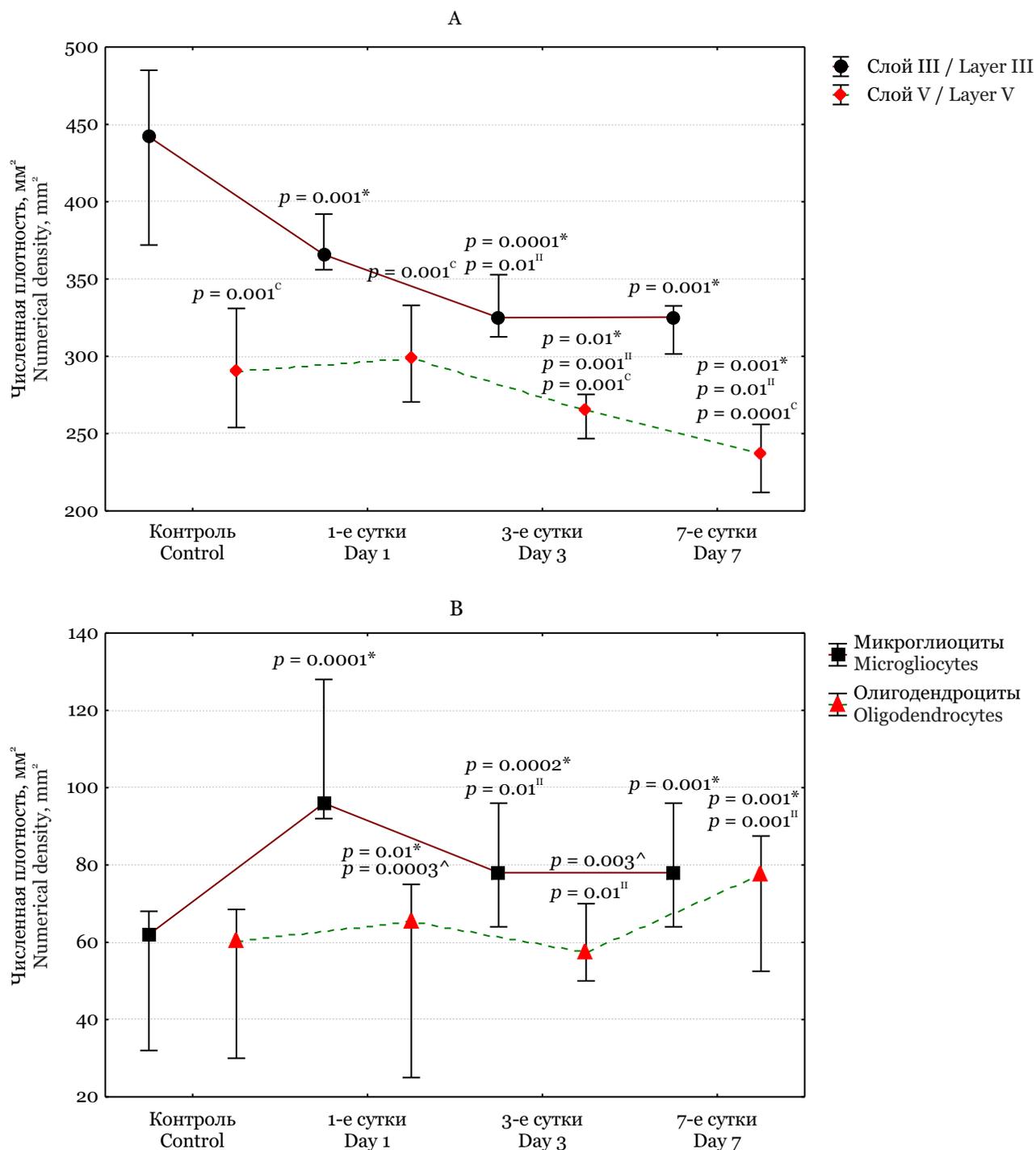


Рис. 5. Численная плотность нейронов (А), микроглиоцитов и олигодендроцитов (В) в СМК в группе контроля и после 40-минутной ООСА. Различия статистически достоверны по сравнению с группой контроля (*), предыдущим сроком (^{II}), МГЦ и ОДЦ (^) и слоями III и V (^C) при $p < 0.001$. Данные представлены как медиана, нижний и верхний квартили (интерквартильный размах)

Fig. 5. Numerical density of neurons (A), microglia and oligodendrocytes (B) in SMC in the control group and after 40-minute CCAO. The differences are statistically significant compared to the control group (*), the previous period (^{II}), MG and OD (^) and layers III and V (^C) at $p < 0.001$. The data are presented as median, lower and upper quartiles (interquartile range)

набухания, гиперхромных тинкториальных изменений, реактивный астроглиоз, увеличение количества микроглиоцитов), которые прежде всего целесообразно рассматривать в контексте активации механизмов естественной защиты нейронов. Известно, что формирование темных нейронов в ответ на энергетический дефицит, увеличение количества ионов водорода (H^+) и свободного кальция (Ca^{++}) может быть связано с конформационными изменениями белков цитоматрикса. В результате образуется большое количество несвязанной воды, которая выдавливается в отростки астроцитов [3, 9, 10]. Мы полагаем, что с этим потоком из темных нейронов удаляются растворенные в воде ишемические токсины и ионы. Просматривается логическая цепочка событий, связанных с темным нейроном: 1) дегидратация-детоксикация; 2) консервирование состояния нейрона без разрушения его цитоматрикса; 3) восстановительная гидратация; 4) нормальное функционирование. На всех этапах этой цепочки ключевую роль играют нейроглиальные клетки, которые регулируют водный поток (астроциты), контролируют степень повреждения и утилизации нейронов (МГЦ), обеспечивают его трофическими факторами (астроциты, ОДЦ, МГЦ) для реализации механизмов нейропластичности.

Таким образом, после 40-минутной ООСА с участием нейронов, ОДЦ, разных фенотипов астроцитов и МГЦ образуются сложные клеточные системы, которые мы рассматриваем в аспекте клеточно-клеточных фагоцитарных и трофических взаимоотношений с учетом пространственно-временных особенностей основного процесса (повреждение, восстановление). В этом направлении перспективным является изучение активации и функционирования разных фенотипов глиальных клеток. Согласно литературным данным МГЦ после активации мигрируют и поглощают сому и апикальные дендриты, астроциты фагоцитируют многочисленные мелкие дендритные апоптотические тела, ОДЦ обеспечивают последующее восстановление аксонов. Все вместе — усиливают синтез нейротрофических факторов и регулируют репаративную реор-

heterogeneity of neuroglial cells is an important direction in the development of neurobiology, neuro-morphology and neuropharmacology. Obtaining new data will allow us to get closer to understanding some mechanisms of neuroplasticity, neuroinflammation and find new ways to correct them.

CONCLUSION

After a 40-minute CCAO, the content of dark neurons in SMC increased and, as a result, signs of hydropic generation appeared. Against this background, the number of satellite OD, astrocytes and MG increased. Probably, edema-swelling, active MG and astrocytes previously (on the 1st–3rd day) sanitize the nerve tissue, ensuring its subsequent (on the 7th day) structural and functional recovery with the participation of OD.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ганизацию нервной ткани в целом [16, 20, 23]. Феномен структурно-функциональной гетерогенности нейроглиальных клеток является важным направлением развития нейробиологии, нейроморфологии и нейрофармакологии. Получение новых данных позволит приблизиться к пониманию некоторых механизмов нейропластичности, нейровоспаления и найти новые пути их коррекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После 40-минутной ООСА в СМК увеличивалось содержание темных нейронов и, как следствие, появлялись признаки гидропической дистрофии. На этом фоне возрастало количество сателлитарных ОДЦ, астроцитов и МГЦ. Вероятно, отек-набухание, активные МГЦ и астроциты предварительно (в 1-е – 3-и сутки) санируют нервную ткань, обеспечивая ее последующее (7-е сутки) структурно-функциональное восстановление с участием ОДЦ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rami A. Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2009. Vol. 35 (5). P. 449–461.
2. Zille M., Farr T.D., Przesdzin I. et al. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives // *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 2012. Vol. 32 (2). P. 213–231.

REFERENCES

1. Rami A. (2009). Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 35 (5), 449–461.
2. Zille M., Farr T.D., Przesdzin I. et al. (2012). Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 32 (2), 213–231.

3. Harris T.C., de Rooij R., Kuhl E. The shrinking brain: cerebral atrophy following traumatic brain injury // *Ann. Biomed. Eng.* 2019. Vol. 47 (9). P. 1941–1959.
4. Cole J.H., Jolly A., de Simoni S. et al. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury // *Brain*. 2018. Vol. 141 (3). P. 822–836.
5. Степанов С.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Степанов А.С., Горбунова А.В. Структурно-функциональная реорганизация ядрышкового аппарата нейронов неокортекса, архикортекса и базальных ганглиев головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий // *Журн. анатомии и гистопатологии*. 2018. Т. 7, № 4. С. 67–74.
6. Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. Морфологические нарушения нейронов гиппокампа крыс с субтотальной и тотальной ишемией // *Оренбургский мед. вестн.* 2020. Т. 8, № 2 (30). С. 41–46.
7. Ahmadvour S., Behrad A., Fernández-Vega I. Dark neurons: A protective mechanism or a mode of death // *J. Med. Histolog.* 2019. Vol. 3 (2). P. 125–131.
8. Bolon B., Garman R., Jensen K. et al. A “best practices” approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing // *Toxicol. Pathol.* 2006. Vol. 34 (3). P. 296–313.
9. Gallyas F., Pál J., Bukovics P. Supravital microwave experiments support that the formation of “dark” neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system // *Brain Res.* 2009. Vol. 1270. P. 152–156.
10. Kövesdi E., Pál J., Gallyas F. The fate of “dark” neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: Neurobiological aspects // *Brain Res.* 2007. Vol. 1147. P. 272–283.
11. Garman R.H. Histology of the central nervous system // *Toxicol. Pathol.* 2011. Vol. 39. P. 22–35.
12. Lychko V.S., Malakhov V.A., Potapov A.A. Morphological changes of the brain tissue in rats with experimental model of ischemic stroke in the dynamics of treatment by immunobiological preparation Cryocell-Cryocord // *СТМ*. 2015. Vol. 7 (4). P. 58–62.
13. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Прекодиционирование клеток мозга к патологическим воздействиям: вовлеченность протеаз (обзор) // *Биохимия*. 2015. Т. 80, № 2. С. 204–213.
14. Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Клеточные системы восстановления и утилизации поврежденных нейронов головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2017. Т. 103, № 10. С. 1135–1147.
15. Степанов А.С., Акулинин В.А., Мыщик А.В., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии // *Общая реаниматология*. 2017. Т. 13, № 6. С. 6–17.
16. Chen Z., Trapp B.D. Microglia and neuroprotection // *J. Neurochem.* 2016. Vol. 136 (1). P. 10–17.
17. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
18. Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S. et al. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate // *Acta Neuropathol.* 2006. Vol. 112. P. 471–481.
3. Harris T.C., de Rooij R., Kuhl E. (2019). The shrinking brain: cerebral atrophy following traumatic brain injury. *Ann. Biomed. Eng.*, 47 (9), 1941–1959.
4. Cole J.H., Jolly A., de Simoni S. et al. (2018). Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury. *Brain*, 141 (3), 822–836.
5. Stepanov S.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Stepanov A.S., Gorbunova A.V. (2018). Reorganization of the nucleolar apparatus of neurons of the neocortex, archicortex and basal ganglia of the brain of white rats after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries. *Journal of Anatomy and Hystopathology*, 7 (4), 67–74. In Russ.
6. Bon E.I., Maksimovich N.E., Zimatkin S.M. (2020). Morphological disorders in the neurons of the rats hippocampus with subtotal and total ischemia. *Orenburg Medical Bulletin*, 8, 2 (30), 41–46.
7. Ahmadvour S., Behrad A., Fernández-Vega I. (2019). Dark neurons: A protective mechanism or a mode of death. *J. Med. Histolog.*, 3 (2), 125–131.
8. Bolon B., Garman R., Jensen K. et al. (2006). A “best practices” approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing. *Toxicol. Pathol.*, 34 (3), 296–313.
9. Gallyas F., Pál J., Bukovics P. (2009). Supravital microwave experiments support that the formation of “dark” neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system. *Brain Res.*, 1270, 152–156.
10. Kövesdi E., Pál J., Gallyas F. (2007). The fate of “dark” neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: Neurobiological aspects. *Brain Res.*, 1147, 272–283.
11. Garman R.H. (2011). Histology of the central nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 39, 22–35.
12. Lychko V.S., Malakhov V.A., Potapov A.A. (2015). Morphological changes of the brain tissue in rats with experimental model of ischemic stroke in the dynamics of treatment by immunobiological preparation Cryocell-Cryocord. *CTM*, 7 (4), 58–62.
13. Yakovlev A.A., Gulyaeva N.V. (2015). Possible role of proteases in preconditioning of brain cells to pathological conditions. *Biokhimiya*, 80, 2, 204–213.
14. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Avdeev D.B. (2017). Cellular systems for the recovery and recycling of damaged brain neurons in white rats after a 20-minute occlusion of common carotid arteries. *Russ. Journal of Physiology*, 103 (10), 1135–1147.
15. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Mysik A.V., Stepanov S.S., Avdeev D.B. (2017). Neuro-glio-vascular complexes of the brain after acute ischemia. *General Reanimatology*, 13, 6, 6–17. In Russ.
16. Chen Z., Trapp B.D. (2016). Microglia and neuroprotection. *J. Neurochem.*, 136 (1), 10–17.
17. Paxinos G., Watson C. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
18. Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S. et al. (2006). The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol.*, 112, 471–481.

19. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. СПб.: Питер, 2003.
20. Eyo U.B., Dailey M.E. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology // *J. Neuroimmune Pharm.* 2013. Vol. 8. P. 494–509.
21. Степанов С.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Степанов А.С., Горбунова А.В. Реорганизация астроцитов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2019. Т. 105, № 5. С. 578–590.
22. Алексеева О.С., Кирик О.В., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Микроглия головного мозга: происхождение, структура и функции // *Журн. эволюционной биохимии и физиологии*. 2019. Т. 55, № 4. С. 231–241.
23. Wagner D.-C., Scheibe J., Glocke I. et al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury // *Acta Neurobiol. Exper.* 2013. Vol. 73 (1). P. 79–87.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Горбунова Анна Владимировна — заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Степанов Сергей Степанович — д-р мед. наук, лаборант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Акулинин Виктор Александрович — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России; профессор кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина».

Авдеев Дмитрий Борисович — канд. ветеринарных наук, докторант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Шоронова Анастасия Юрьевна — заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Макарьева Любовь Михайловна — очный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Конеv Владимир Павлович — заслуженный работник высшей школы РФ, д-р мед. наук, профессор кафедры судебной медицины, правоведения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Образец цитирования: Горбунова А.В., Степанов С.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М., Конев В.П. Гидропическая дистрофия сенсорной коры белых крыс в контексте формирования темных нейронов и изменения нейроглиальных взаимоотношений после краткосрочной окклюзии общих сонных артерий // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2021. № 3. С. 66–81.

19. Borovikov V. (2003). *Statistica. The Art of Data Analysis Using Computer: for Professionals*. Saint Petersburg. In Russ.
20. Eyo U.B., Dailey M.E. (2013). Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J. Neuroimmune Pharm.* 8, 494–509.
21. Stepanov S.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Stepanov A.S., Gorbunova A.V. (2019). Reorganization of the rat neocortical astrocytes after 20-min occlusion of the common carotid arteries. *Russ. Journal of Physiology*, 105, 5, 578–590.
22. Alekseeva O.S., Kirik O.V., Gilerovich E.G., Korzhevskii D.E. (2019). Microglia of the brain: origin, structure and functions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 55, 4, 231–241.
23. Wagner D.-C., Scheibe J., Glocke I. et al. (2013). Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neurobiol. Exper.*, 73 (1), 79–87.

ABOUT THE AUTHORS

Gorbunova Anna Vladimirovna — Part-time Postgraduate Student, Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University.

Stepanov Sergey Stepanovich — Dr. Sci. (Med.), Assistant, Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University.

Akulinin Viktor Aleksandrovich — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University; Professor, Department of Zooculture, Omsk State Agrarian University n.a. P.A. Stolypin.

Avdeev Dmitry Borisovich — Cand. Sci. (Vet.), Doctoral Student, Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University.

Shoronova Anastasia Yurievna — Part-time Postgraduate Student, Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University.

Makaryeva Lyubov Mikhailovna — Full-time Postgraduate Student, Omsk State Medical University.

Konev Vladimir Pavlovich — Honored Worker of Higher Education of the Russian Federation, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Forensic Medicine, Jurisprudence, Omsk State Medical University.

Citation example: Gorbunova A.V., Stepanov S.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Shoronova A.Yu., Makaryeva L.M., Konev V.P. (2021). Hydropic degeneration of the sensorimotor cortex of white rats in the context of the formation of dark neurons and changes in neuroglial relationships following short-term common carotid arteries occlusion. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 3, 66–81.