

Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии

А. С. Степанов, В. А. Акулинин,
А. В. Мыщик, С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев

Омский государственный медицинский университет Минздрава России,
Россия, 644099, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

Neuro-Glio-Vascular Complexes of the Brain After Acute Ischemia

Alexander S. Stepanov, Victor A. Akulinin,
Alexey V. Mysik, Sergey S. Stepanov, Dmitry B. Avdeev

Omsk State Medical University, Ministry of Health of Russia,
12 Lenin Str., Omsk 644099, Russia

Цель исследования — сравнительное изучение структурно-функционального состояния нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов соматосенсорной коры (ССК), СА1 гиппокампа и миндалевидного тела (МТ) головного мозга белых крыс в норме и после острой ишемии, вызванной 20-минутной окклюзией общих сонных артерий.

Материалы и методы. В эксперименте с помощью электронной и флуоресцентной микроскопии (окраска DAPI) были изучены нейроны, астроциты, эндотелиоциты, перициты, базальная мембрана микрососудов головного мозга в норме ($n=5$) и реперфузионном периоде (1-, 3-, 7-, 14-, 21- и 30-е сут.; $n=30$). Морфометрический анализ провели с помощью программы ImageJ 1.46.

Результаты. В восстановительном периоде после ишемии отметили реактивные (отек-набухание, тинкториальные свойства клеток) и компенсаторно-восстановительные (гиперплазия, гипертрофия, пролиферация, усиление транскитоза) изменения нейро-глио-сосудистых комплексов. После ишемии количество нейронов уменьшалось (на 8,7%—55,3%), а содержание глиальных клеток возрастало в 2—3 раза. Увеличение нейроглиального индекса (НГИ) сопровождалось: 1) появлением микрососудов с многочисленными разветвленными отростками перицитов, 2) усложнением пространственной организации базальных мембран, 3) структурными признаками активации процессов транскитоза (большое количество кавеол, гладких и клатриновых везикул, крупных везикул) в перицитах и эндотелиальных клетках.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об компенсаторно-восстановительных изменениях компонентов нейро-глио-сосудистых комплексов ССК, СА1 гиппокампа и МТ головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. Наиболее полно реализация механизмов защиты и восстановления поврежденных нейронов происходит в ССК и МТ, обладающих высоким НГИ.

Ключевые слова: головной мозг; нейроны; астроциты; капилляры; ультраструктура; флуоресценция DAPI; гематоэнцефалический барьер; морфометрия

The purpose of the study is to compare the structural and functional state of neuro-glio-vascular microstructural complexes of the somatosensory cortex (SSC), CA1 of the hippocampus and amygdala of the brain of white rats under normal conditions and after acute ischemia caused by a 20-minute occlusion of common carotid arteries.

Materials and methods. In this experiment, neurons, astrocytes, endotheliocytes, pericytes, basal membrane of the microvessels were studied in the normal ($n=5$) and the reperfusion period (1, 3, 7, 14, 21 and 30 days, $n=30$) using electron and fluorescence microscopy (DAPI staining). The morphometric analysis was carried out using the ImageJ 1.46 software.

Results. During the recovery period after ischemia was noted reactive (edema-swelling, tinctorial properties of cells) and compensatory-restoration (hyperplasia, hypertrophy, proliferation, increased transcytosis) changes in neuro-glia-vascular complexes. After ischemia, the number of neurons decreased (by 8.7%—55.3%), and the glial cell count 2—3 fold increased. Increasing neuroglial index (NGI) was accompanied by: 1) the emergence of microvessels with numerous branched processes of pericytes, 2) the complication of the spatial organization of basal membranes, and 3) the structural features of activation of transcytosis processes (large number of caveolae, smooth and clathrin vesicles, large vesicles) in pericytes and endothelial cells.

Conclusion. These findings indicate the compensatory-restoration changes in the components of neuro-glio-vascular complexes SSC, CA1 of the hippocampus and amygdala of white rat's brain after a 20-minute occlusion of

Адресс для корреспонденции:

Виктор Акулинин
E-mail: akulinin@omsk-osma.ru

Correspondence to:

Viktor A. Akulinin
E-mail: akulinin@omsk-osma.ru

the common carotid arteries. The most complete implementation of mechanisms for the protection and repair of damaged neurons occurs in the SSC and amygdala exhibiting high NGI values.

Keywords: brain; neurons; astrocytes; capillaries; ultrastructure; DAPI fluorescence; blood-brain barrier; morphometry

DOI:10.15360/1813-9779-2017-6-6-17

Введение

Известно, что в процессе эмбриогенеза происходит переход от диффузного трофического обеспечения нейробластов к модульной организации сосудистого русла, снабжающего нейроны головного мозга млекопитающих. В зрелом мозге формируются сложные частично автономные структурно-функциональные системы (клеток, базальных мембран и межклеточного пространства) со специфическими и неспецифическими внутренними локальными связями — нейро-глио-сосудистые микроструктурные комплексы [1–3]. В эти комплексы входят несколько типов клеток: нейроны, глиальные клетки (фибрилярные и протоплазматические астроциты), перициты и эндотелиоциты [3–6].

При изучении свойств ГЭБ в норме и при ишемической патологии большое внимание уделяется перицитам и эндотелиальным клеткам, которые рассматриваются важной частью нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов головного мозга. Эти клетки участвуют в синтезе макромолекул, их транспорте через ГЭБ (транцитоз) [7–11], обеспечивают компенсаторную реорганизацию микрососудистого русла и неоангиогенез в норме и при патологии [12, 13].

По данным литературы, в процессе изучения транцитоза в ГЭБ была выявлена роль везикуло-тубулярных структур клеток — кавеол, простых и клатриновых везикул, способных образовывать трансэндотелиальные каналы и переносить крупные макромолекулы. Установлено, что транцитоз и образование трансэндотелиальных каналов активизируются при травмах мозга [14]. Актуальным также является исследование состояния нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов в эксперименте при постишемической реперфузии [15].

Цель настоящего исследования — сравнительное изучение структурно-функционального состояния нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов соматосенсорной коры, СА1 гиппокампа и миндалевидного тела головного мозга белых крыс в норме и после острой ишемии, вызванной 20-минутной окклюзией общих сонных артерий.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета. Данное исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета.

Introduction

It is known that during embryogenesis there is a transition from diffuse trophic supply of neuroblasts to the modular organization of the vascular bed supplying mammalian neurons to the brain. Complex, partially autonomous structural-functional systems (cells, basal membranes and intercellular space) with specific and nonspecific internal local bonds are formed in the mature brain. They are called neuro-glio-vascular microstructural complexes [1–3]. These complexes include several types of cells: neurons, glial cells (fibrillar and protoplasmic astrocytes), pericytes and endotheliocytes [3–6].

When studying properties of the blood-brain barrier (BBB) under normal conditions and in the case of ischemia, much attention is paid to pericytes and endothelial cells, which are considered an important part of the neuro-glio-vascular microstructure of the complexes of the brain. These cells are involved in the synthesis of macromolecules, their transport (transcytosis) through the BBB [7–11], provide compensatory reorganization of microvascular bed and angiogenesis under normal and pathological conditions [12, 13].

According to literature data, studies of transcytosis in the BBB demonstrated the contribution of vesicle-tubular structures of cells (caveolae, simple and clathrin vesicles capable of forming transendothelial canals and transferring large macromolecules). It has been established that transcytosis and the formation of transendothelial canals are activated in brain traumas [14]. Studies neuro-glio-vascular microstructural complexes in experiments using postischemic reperfusion models were focused on only local alterations [15].

The purpose of this study was to compare the structural and functional state of neuro-glio-vascular microstructural complexes of somatosensory cortex, hippocampus and amygdala of the white rats brain in norm and after acute ischemia caused by a 20-minute occlusion of common carotid arteries.

Materials and Methods

The work was carried out at the Omsk State Medical University. This study was approved by the institutional Ethical Committee.

White outbred rats (males) weighing 180–200 g were used as experimental animals. The animals were kept in the usual vivarium under conditions regulated by the requirements of Resolution No. 51 of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation as of August 29, 2014 «Sanitary and epidemiological requirements for the construction, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivarium). «The qualitative and quantitative composition of the

В качестве экспериментальных животных использовали белых беспородных крыс (самцы) массой 180–200 г. Животные содержались в обычном виварии в условиях, регламентированных требованиями Постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Качественный и количественный состав рациона определяли по нормам, утвержденным Приказом МЗ РФ № 163 от 10.03.96. Исследования проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77 №755) и с рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента №2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

В экспериментальном исследовании провели сравнение структурно-функционального состояния нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов соматосенсорной коры (ССК, слои III, V), гиппокампа (CA1) и миндалевидного тела (МТ; суммарно базально-латеральный комплекс, центрально-медиальные ядра и корково-медиальные ядра) головного мозга белых крыс ($n=30$) через 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут после острой 20-минутной ишемии мозга, вызванной пережатием общих сонных артерий (двух-сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии). Эта модель позволяла остановить кровоток на длительное время, за которое формировалось устойчивое патологическое состояние, активировались механизмы некроза и апоптоза, развивалась вторичная ишемия [16]. Контролем служили интактные животные ($n=5$).

Головной мозг фиксировали путем перфузии смеси 1% раствора глутарового альдегида, 4% раствора параформа на 0,1 М фосфатном буфере (pH – 7,4) и 5% раствора сахарозы через восходящую часть дуги аорты под давлением 90–100 мм рт. ст. в течение 15 мин и путем иммерсии в аналогичном растворе. Затем извлекали головной мозг, выделяли, согласно атласу [17], фрагменты ССК, CA1 гиппокампа и МТ, рассекали на конечные блоки, контрастировали 1–2 ч в 1% незабуференном растворе четырехоксида осмия, промывали, обезвоживали и заключали в смесь эпона и аралдита. Для электронной микроскопии использовали ультратонкие (70–100 нм) срезы, которые окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца на сетках без подложки. Для получения срезов использовали ультрамикротомы УМТП-4 (Сумский завод, Украина) и LKB-8800 (Швеция), а для их просмотра – микроскопы ЭМВ-100ЛМ (Украина) и Hitachi-600Н (Япония). В каждом случае фотографировали по 10 полей зрения (на пластины 9×12 см) при увеличении 12000. На оцифрованных электронограммах проводили качественную оценку нейронов, астроцитов, эндотелиальных клеток и перicyтов.

Окраску по Ниссли использовали для общей качественной оценки нервной ткани изученных отделов головного мозга экспериментальных животных. Для визуализации клеточных ядер нейронов, астроцитов, перicyтов и эндотелиальных клеток использовали окраску DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), который проникает через неповрежденные мембраны и избирательно связывается с ядерной ДНК. При облучении ультрафиолетом ядра испускают синее свечение [18]. Применяли двухканальную флуоресценцию для одновременного выявления

diet was determined according to the regulations approved by Order No. 163 of the Ministry of Health of the Russian Federation as of 10.03.1996. The studies were carried out in accordance with the «Guidelines for carrying out works using experimental animals» (Appendix to Order No. 755 of the USSR Ministry of Health as of 12.08.1977) and with the recommendations of the International Committee on Laboratory Animals Science supported by WHO, and European Parliament Directive No. 2010/63/EU as of 22.09.2010 «On the protection of animals used for scientific purposes».

In the experimental study, the structural and functional state of neuro-glio-vascular microstructural complexes of the somatosensory cortex (SSC, layers III and IV), hippocampus (CA1) and the amygdala (AM; basolateral complex, central-medial nuclei, and corticomедial nuclei) in the brain of white rats ($n=30$) was compared 1, 3, 7, 14, 21 and 30 days after acute 20-minute cerebral ischemia due to cross-clamping of common carotid arteries (2-vascular incomplete model of global ischemia without hypotension). This model permitted to stop the circulation for a long time enough to develop a stable pathological condition due to activation of the mechanisms of necrosis and apoptosis and developing the secondary ischemia [16]. Intact animals were used as a reference group ($n=5$).

The brain was fixed by perfusion of a mixture of 1% glutaraldehyde solution, 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and 5% sucrose solution through the ascending part of the aortic arch at a pressure of 90–100 mm Hg for 15 minutes and by immersion in a similar solution. Then, the brain was removed and fragments of the SSC, hippocampus and AM were extracted according to the atlas [17], dissected into final blocks, embedded in 1% non-buffered osmium tetroxide solution for 1–2 hours, washed, dehydrated and enclosed into an epon-araldite mixture. Ultrathin (70–100 nm) sections were used for electronic microscopy; they were stained with uranyl acetate and lead citrate on meshes without a substrate. Thin sections were performed by ultramicrotomes UMTP-4 (Sumy factory, Ukraine) and LKB-8800 (Sweden); microscope Hitachi-600H (Japan) was used for their inspection. Under the microscope, in each case, 10 random fields were chosen and photographed at a 12 000 magnification. A qualitative evaluation of neurons, astrocytes, endothelial cells and pericytes was carried out on digitized electron diffraction patterns.

Nissle staining was used for general qualitative assessment of the nervous tissue of the studied parts of the brain of experimental animals. Neuron, astrocyte, pericyte and endothelial cell nucleus visualization was performed using DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole), which penetrates intact membranes and selectively binds to nuclear DNA. When it is irradiated with ultraviolet, the nuclei emit a blue glow [16]. Two-channel fluorescence was used to simultaneously detect DAPI and NSE (neuron-specific enolase) in neurons. Immunofluorescent stain for the NSE labeled the neuronal cytoplasm (red), and the fluorescent color for DAPI emphasized the DNA of the nuclei (various shades of blue) of all cells of the neural tissue. Primary rabbit polyclonal antibodies (ImG) (Rabbit Anti Human NSE Polyclonal Antibody; Spring Bioscience, Pleasanton, USA, No. E3304) were used for determining the NSE at a dilution of 1:300. The visualization was carried out using the fluorescent stain Texas Red conjugated secondary reagent goat polyclonal antibodies to Rabbit IgG – H&L (Texas RedR), No. ab6719, Abcam, UK, in dilution 1:200.

The DAPI working solution at a concentration of 0.02 µg/mL was placed on slides, exposed for 15 minutes at room temperature, and then the glasses were washed twice with 0.05% phos-

в нейронах DAPI и NSE (нейронспецифическая енолаза). Иммунофлуоресцентная окраска на NSE маркировала цитоплазму нейронов (красная), а флуоресцентная окраска DAPI выявляла ДНК ядер (различные оттенки синего) всех клеток нервной ткани. Для определения NSE использовали первичные кроличьи поликлональные антитела (ImG) (Rabbit Anti Human NSE Polyclonal Antibody; Spring Bioscience, Pleasanton, USA, № E3304), разведение 1:300. Визуализация осуществлялась с помощью конъюгированного с флуоресцентным красителем вторичного реагента — поликлональных антител козы против IgG — H&L кролика (TexasRed®), № ab6719, Abcam, Великобритания, в разбавлении 1:200.

Рабочий раствор DAPI в концентрации 0,02 мкг/мл помещали на слайды, экспонировали в течение 15 мин при комнатной температуре, затем стекла дважды промывали 0,05% фосфатным буфером, заключали в смесь глицерина с дистиллированной водой 1:9 и накрывали покровными стеклами. 100, камерой на CCD датчике — AxioCam MRc и объективом EC Plan-Neofluar ×40 (апертура 0.9) получали цифровые микрофотографии (размер изображения 1300×1030 пикселей, фактический размер — 220×174 мкм). Применяли 2 фильтра производства Karl Zeiss: набор 00, возбуждение BP 530–585, светоделитель FT 600, испускание LP 615 для Texas Red® и набор 02, возбуждение G 365, светоделитель FT 395, испускание LP 420 для DAPI. Программой AxioVision производили захват изображения с каждого среза общей площадью 382800 мкм² (10 микрофотографий) через все слои неокортекса, дважды для каждого изображения, поскольку использовались два набора фильтров, формировали двухслойные графические файлы [19]. Нейроглиальный индекс (НГИ) рассчитывали путем соотношения общей численной плотности (в пересчете на 1 мм² поля зрения) ядер глиальных клеток и ядер нейронов (пирамидных в ССК и гиппокампе, мультиполярных в МТ). Эти достаточно крупные нейроны легко верифицировались, так как их цитоплазма была окрашена на NSE в красный цвет.

Получение основных количественных показателей, определение характера распределения вариационных рядов, проверку статистических гипотез осуществляли с помощью программ MedCalc® и StatSoft Statistica 8.0. Использовали непараметрические критерии (Вилкоксона, Манна-Уитни, однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, λ^2 — критерий Пирсона). Материал представлен как медиана (*Me*), нижний (*Ql*) и верхний (*Qu*) квартили. В ходе проведения статистического анализа нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Фиксация головного мозга с помощью перфузии под физиологическим давлением позволила более точно показать пространственную организацию нейро-глио-сосудистого микроструктурного комплекса. На таких препаратах капилляры были развернуты, их просветы имели круглую или овальную форму, люминальная поверхность эндотелиоцитов не образовывала складок, а в цитоплазме отсутствовали крупные вакуоли, скопления мелких везикул и кавеолы (рис. 1, *a, b*).

Структура капилляров в норме представлена тонкой базальной мембраной и двумя типами кле-

phate buffer, enclosed in a mixture of glycerin with distilled water (1:9) and covered with cover slips. 100, a camera on a CCD sensor — AxioCam MRc and an EC Plan-Neofluar ×40 lens (aperture 0.9) received digital micrographs (image size 1300×1030 pixels, actual size: 220×174 μm). Two Karl Zeiss filters were used: kit 00, excitation BP 530–585, beam splitter FT 600, emission LP 615 for Texas Red® and kit 02, excitation G 365, beam splitter FT 395, emission LP 420 for DAPI. The AxioVision software captured images from each section with a total area of 382,800 μm² (10 microphotographs) through all the layers of the neocortex, twice for each image, because two sets of filters were used, and two-layered image files were formed [19]. The neuroglial index (NGI) was calculated by correlating the total numerical density (per 1 mm² of the field of view) of glial cell nuclei and neuron nuclei (pyramidal neurons in the SSC and hippocampus and multipolar ones in the AM). Relatively large neurons were easily verified, as their cytoplasm was staining red with the NSE.

Basic quantitative parameters and statistical analysis was performed with the aid of software MedCalc® StatSoft Statistica 8.0. Nonparametric tests (Wilcoxon, Mann-Whitney, one-way ANOVA Kruskal-Wallis, λ^2 — Pearson criterion) were employed to determine the significance of differences. Data are expressed as a median (*Me*), lower (*Ql*) and upper (*Qu*) quartile. In the course of statistical analysis the null hypothesis was rejected at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Perfusion under physiological pressure made it possible to reveal the spatial organization of the neuro-glio-vascular microstructural complex. Fig. 1, *a, b* demonstrated that capillaries were unfolded, their lumens were round or oval in shape, the luminal surface of the endotheliocytes did not form folds, and there were no large vacuoles, clusters of small vesicles and caveolae in the cytoplasm.

The structure of capillaries is normally represented by a thin basal membrane and two types of cells: endothelial cells lining the capillary from the inside and pericytes located in the duplication of the basal membrane (Fig. 1, *b*). Caveolae and vesicles (endoplasmic vesicles, organizers of macromolecular flows in the cytoplasm) were normally small (Fig. 1, *b*). The cytoplasm of the cells contained a small amount of organelles; clusters of condensed chromatin were observed along the periphery of the nuclei. Normally, these cells lacked degradation products. Astrocytes and neurons were located near the vessels (Fig. 1, *a, b*).

The spatial composition of the neuro-glio-vascular microstructural complex depended on the neuronal distribution density and differed in the SSC, hippocampus and AM. In the hippocampus, the neurons were very densely distributed, not separated by neuropil, and there were 2–4 or more pyramidal neurons per glial cell (NGI=0.25–0.5). In the AM, neuro-glio-vascular microstructural complexes were separated by extended areas of the neuropil (Fig. 1, *a*). There was one neuron per up to 3 gliocytes (NGI=3.0). In the SSC, there was one neuron per 1–2 gliocytes (NGI=2.0).

In the acute postischemic period (1 and 3 days) structural changes associated with disturbances of en-

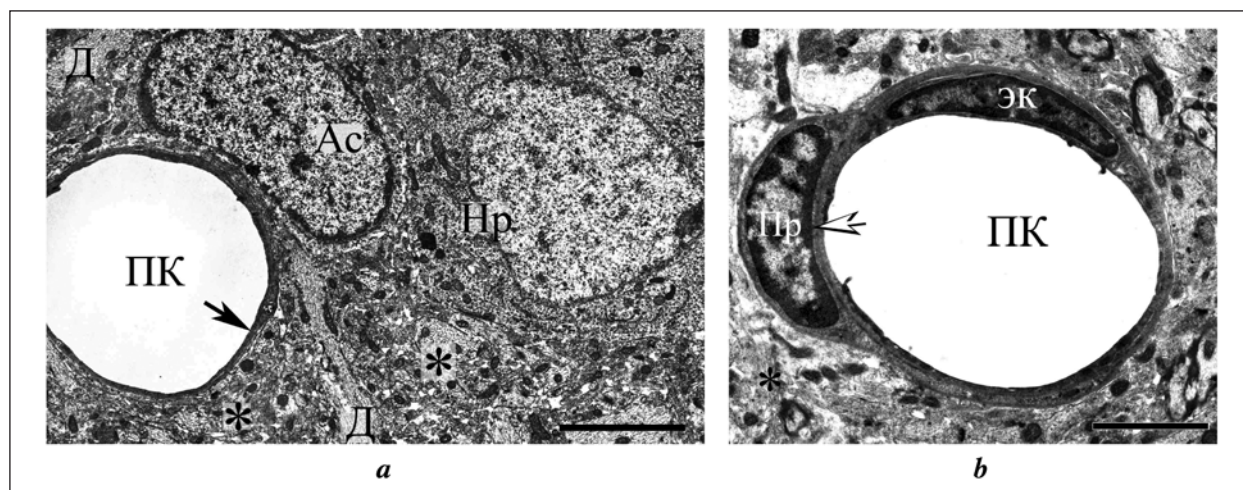


Рис. 1. Электронограмма миндалевидного тела головного мозга белой крысы в норме.

Fig. 1. The amygdala complex of a white rat is normal, e-gramma.

Note. *a* – neuro-glio-vascular microstructure complex, a capillary in a native state without folds of the endothelium, a multipolar neuron, an astrocyte, dendrites and a neuropil; *b* – the ultrastructure of all components of the pericaryon (nucleus, cytoplasm with organelles) and neuropilia without signs of damage and swelling, mitochondria are dark compact. Ac – astrocyte; Д – dendrite; Нр – neuron (pericaryon); * – neuropil; ПК – capillary lumen; Пр – pericyte; arrow – endothelial capillary cell. Fixation by perfusion, staining with uranyl acetate and lead citrate. Magnification $\times 8000$; scale – 3 μm (*a*); 2 μm (*b*).

Примечание. *a* – нейро-глио-сосудистый микроструктурный комплекс, капилляр в нативном состоянии без складок эндотелия, мультиполярный нейрон, астроцит, дендриты и нейропил; *b* – ультраструктура всех составляющих перикариона (ядро, цитоплазма с органеллами) и нейропиля без признаков повреждения и отека-набухания, митохондрии темные компактные. Ас – астроцит; Д – дендрит; Нр – нейрон (перикарион); * – нейропил; ПК – просвет капилляра; Пр – перицит; стрелка – эндотелиальная клетка капилляра. Фиксация перфузией, окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение $\times 8000$; шкала – 3 мкм (*a*); 2 мкм (*b*).

ток – эндотелиальными, выстилающими капилляр изнутри, и перицитами, расположенными в дупликации базальной мембраны (рис. 1, *b*). Кавеол и везикул (эндоплазматические пузырьки, организаторы макромолекулярных потоков в цитоплазме) в норме было мало (рис. 1, *b*). Цитоплазма клеток содержала небольшое количество органелл, по периферии ядер отмечались скопления конденсированного хроматина. В норме в этих клетках практически отсутствовали продукты деградации. Рядом с сосудами располагались астроциты и нейроны (рис. 1, *a, b*).

Пространственная композиция нейро-глио-сосудистого микроструктурного комплекса зависела от плотности распределения нейронов и отличалась в ССК, гиппокампе и МТ. В гиппокампе нейроны располагались очень плотно, практически не разделялись нейропилем, и поэтому на одну глиальную клетку приходилось 2–4 и более пирамидных нейрона (НГИ=0,25–0,5). В МТ нейро-глио-сосудистые микроструктурные комплексы разделялись протяженными участками нейропиля (рис. 1, *a*). На один нейрон приходилось до 3-х глиоцитов (НГИ=3,0). В ССК на один нейрон приходилось до 2-х глиоцитов (НГИ=2,0).

В остром постишемическом периоде (1- и 3-е сут.) выявили структурные изменения, связанные с нарушениями энергозависимых водно-электролитного и белкового обмена, приводящие к изменению коллоидно-осмотического давления в клет-

ergy-dependent water-electrolyte and protein metabolism leading to a change in the colloid-osmotic pressure in the cell and the development of cytotoxic edema-swelling were observed. Fibrillar astrocytes around microvessels, protoplasmic astrocytes and other structures of the neuropil (synaptic terminals, small dendrites) were mostly damaged (Fig. 2, *a*). The death of neurons occurred by necrosis and apoptosis (Fig. 2, *b*).

It was found that processes of detoxification and utilization of irreversibly damaged (necrosis, apoptosis) cells of the brain were activated in the early recovery period. Cells of the neuro-glio-vascular microstructure complex (endothelial cells, pericytes, astrocytes) as well as oligodendrogliaocytes and microgliaocytes were major contributors to this process. Manifestations of transcytosis significantly increased in endothelial cells and pericytes (Fig. 3).

It is important that microcirculatory disorders and insufficiency of draining and sanitizing mechanisms due to edematous damage of a part of the glial cells were preserved in all studied parts of the brain not only 1 and 3 days after the reperfusion, but also in the later recovery period (7 and 14 days). We found out moderate edema of the processes of astrocytes, compression of the lumen of microvessels, alterations of erythrocytes, vacuolization of the cytoplasm of endothelial cells, folds and outgrowths of the lamellar membrane of these cells, signs of thrombogenesis (platelet aggregation) in the lumen of the vessels (Fig. 3, *a, b*). Large number of mi-

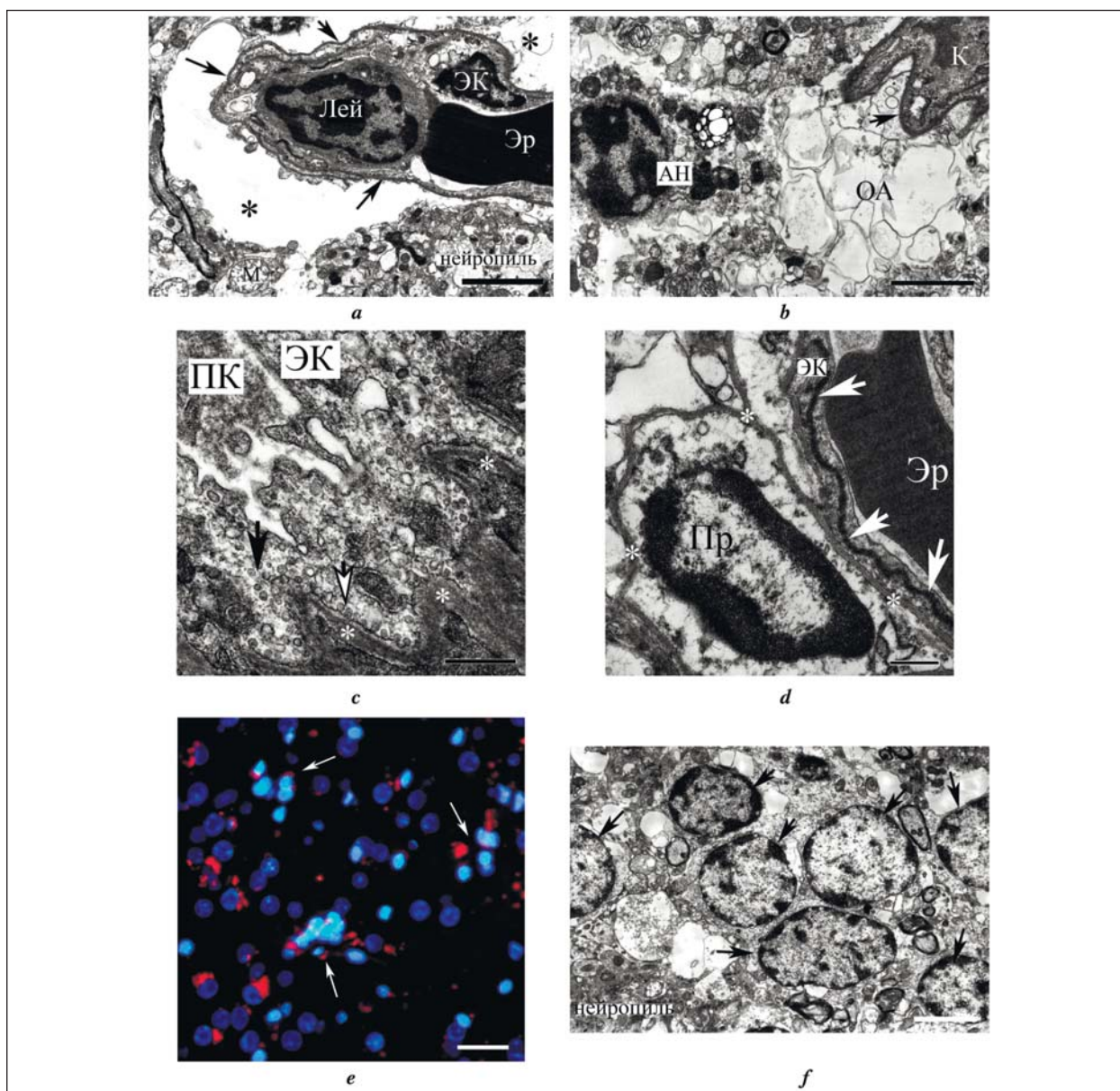


Рис. 2. Электронограмма и флуорисцентная микроскопия слоя III соматосенсорной коры головного мозга белой крысы в постшемическом периоде.

Fig. 2. Layer III somatosensory cortex of a white rat in the postischemic period, e-gamma and fluorescence microscopy.

Note. *a* – 1 day after – there are pronounced hydroptic changes, the appearance of free fluid in the perivascular and intercellular space (*), intravascular aggregation of blood elements (erythrocytes, leukocytes). *b* – 3 days after – there are swelling, destruction of the processes of astrocytes, apoptosis of the neuron. *c* – 1 day after – there are formation of a large number of caveolae (white arrow) at the border with the basal membrane (*) and vesicles (black arrow) in the cytoplasm of the capillary endothelial cell. *d* – of pericyte, ultrastructural preservation of the basal membrane (*), endothelium and its zones of continuous dense intercellular contacts (white arrows). *e, f* – 7 days after – there is a local increase in the number of protoplasmic astrocytes (arrows). *e* – fluorescence microscopy, astrocyte nuclei is bright oval, nuclei of neurons is dark blue, cytoplasm is red. *f* – electron microscopy, a group of astrocytes (arrows). АН – apoptotic altered neuron; ОА – processes of astrocyte; К – capillary; Лей – leukocyte; М – mitochondria; ЭК – endothelial cell; Эр – erythrocyte; arrow – basal membrane. Staining with uranyl acetate and lead citrate. Magnification $\times 10500$; scale – $2\ \mu\text{m}$ (*a, b*) and $500\ \text{nm}$ (*c, d*); magnification $\times 9500$; scale – $2\ \mu\text{m}$ (*f*). Fluorescent staining of DAPI and immunofluorescent on NSE (*e*), the increase in lens $\times 40$; scale – $20\ \mu\text{m}$.

Примечание. *a* – через 1 сут. – выраженные гидропические изменения, появление свободной жидкости в периваскулярном и межклеточном пространстве (*), внутрисосудистая агрегация форменных элементов крови (эритроцитов, лейкоцитов). *b* – через 3 сут. – отек-набухание, разрушение отростков астроцитов, апоптоз нейрона. *c* – через 1 сут. – образование большого количества кавеол (белая стрелка) на границе с базальной мембраной (*) и везикул (черная стрелка) в цитоплазме эндотелиальной клетки капилляра. *d* – отек-набухание перicyта, ультраструктурная сохранность базальной мембраны (*), эндотелия и его зон непрерывных плотных межклеточных контактов (белые стрелки). *e, f* – через 7 сут. – локальное увеличение количества протоплазматических астроцитов (стрелки). *e* – флуоресцентная микроскопия, ядра астроцитов – яркие овальные, ядра нейронов – темно-синие, цитоплазма – красная. *f* – электронная микроскопия, группа астроцитов (стрелки). АН – апоптозно измененный нейрон; ОА – отростки астроцита; К – капилляр; Лей – лейкоцит; М – митохондрия; ЭК – эндотелиальная клетка; Эр – эритроцит; стрелка – базальная мембрана. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение $\times 10500$, шкала – $2\ \mu\text{м}$ (*a, b*) и $500\ \text{нм}$ (*c, d*); увеличение $\times 9500$, шкала – $2\ \mu\text{м}$ (*f*). Флуоресцентная окраска DAPI и иммунофлуоресцентная на NSE (*e*), объектив $\times 40$, шкала – $20\ \mu\text{м}$.

ке и развитию цитотоксического отека-набухания. В наибольшей степени повреждались отростки фибриллярных астроцитов вокруг микрососудов, протоплазматических астроцитов и других структур нейропиля (синаптические терминалы, мелкие дендриты) (рис. 2, *a*). Гибель нейронов осуществлялась путем некроза и апоптоза (рис. 2, *b*).

Нами выявлено, что на фоне цитотоксического отека-набухания в раннем восстановительном периоде активировались процессы детоксикации и утилизации необратимо поврежденных (некроз,

кровельных с богато разветвленными отростками перicytes (Fig. 3, *a, b*) и структурными признаками активации процессов трансцитоза (кавеолы, простые и клатриновые везикулы) в перicytes и эндотелиальных клетках были замечены (Fig. 3, *c, d*).

Данные демонстрируют, что период восстановления после окклюзии сонной артерии сопровождался реактивной, компенсаторной и репаративной реорганизацией нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов.

В отдаленном постischemическом периоде (21 и 30 дней), проявлениями активной трансцитоза прак-

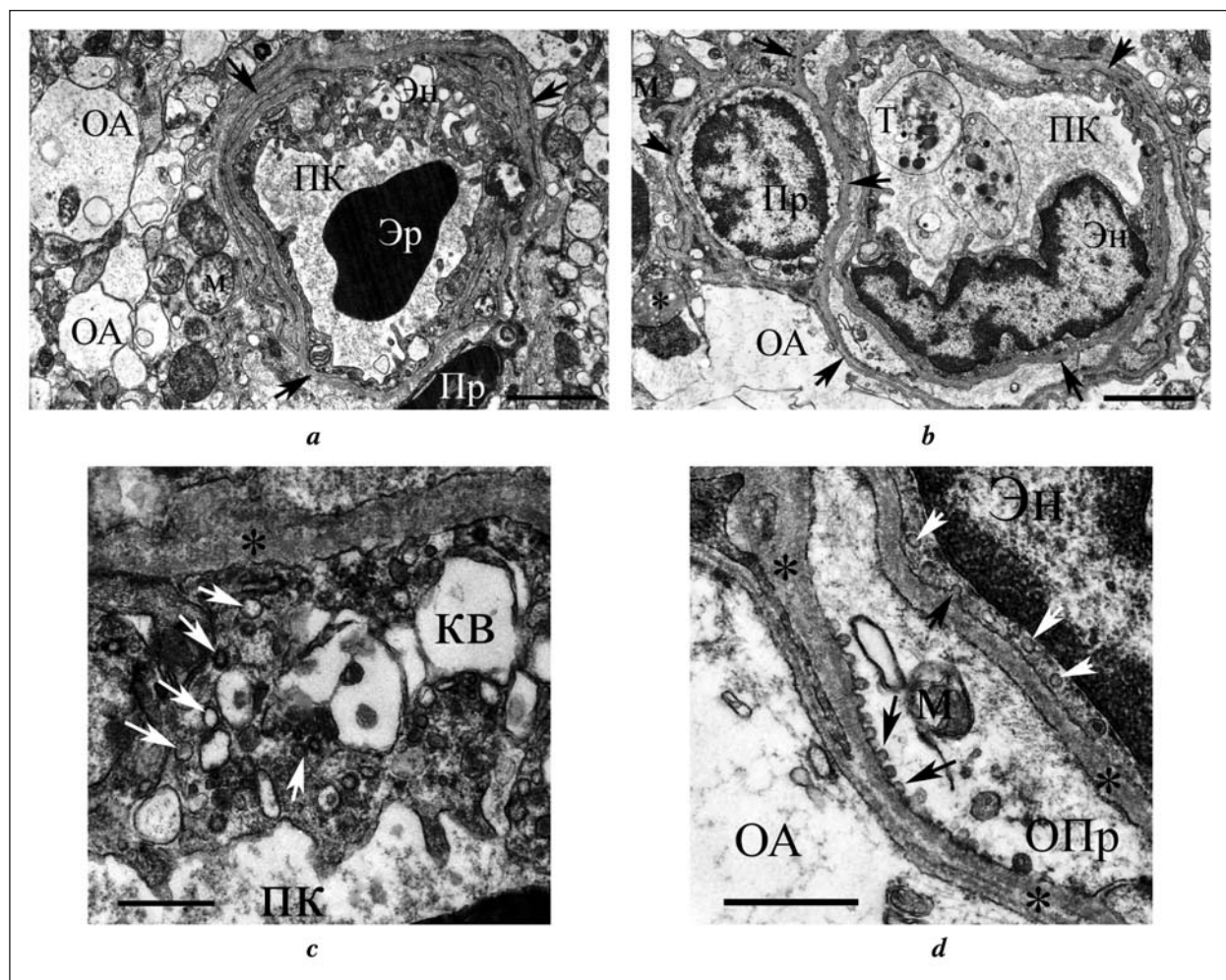


Рис. 3. Электронограмма микрососудов в слое III соматосенсорной коры головного мозга белой крысы в постischemическом периоде.
Fig. 3. Microvessels in the layer III of somatosensory cortex of white rats in the postischemic period, e-gramma.

Note. *a* (7 days) and *b* (14 days) – moderate manifestations of edema swelling of perivascular processes of astrocytes; the accumulation of platelets in the lumen of the vessel; complex spatial organization of the basal membrane (black arrows), a large number of powerful branched processes of pericytes. *c* – high density of caveolae (black arrows) in the process of pericyte on the border with the basal membrane (*). *d* – a significant accumulation (white arrows) of smooth and clathrin (fringed) vesicles in the cytoplasm of the endotheliocyte, the appearance of large vesicles (KB), outgrowths and invaginations of the cytolemma, thickening of the basal membrane (*). OA – appendages of astrocyte; ОПр – processes of pericytes; ПК – lumen of capillary; М – mitochondria; Т – platelet; ЭК – endothelial cell; Эр – erythrocyte. Staining with uranyl acetate and lead citrate. Magnification $\times 10500$; scale – 2 μm (*a, b*), 500 nm (*c*) and 250 nm (*d*). *b* – is enlarged fragment *a*; *d* – is enlarged fragment *b*.

Примечание. *a* (7 сут.) и *b* (14 сут.) – умеренные проявления отека набухания периваскулярных отростков астроцитов; скопление тромбоцитов в просвете сосуда; сложная пространственная организация базальной мембраны (черные стрелки), большое количество мощных разветвленных отростков перicyтов; *c* – высокая плотность кавеол (черные стрелки) в отростке перicyта на границе с базальной мембраной (*); *d* – значительное скопление (белые стрелки) гладких и клатриновых (окаймленных) везикул в цитоплазме эндотелиоцита, появление крупных везикул (KB), выростов и инвагинаций цитолеммы, утолщение базальной мембраны (*). OA – отростки астроцита; ОПр – отростки перicyтов; ПК – просвет капилляра; М – митохондрия; Т – тромбоцит; ЭК – эндотелиальная клетка; Эр – эритроцит. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение $\times 10500$, шкала – 2 мкм (*a, b*), 500 нм (*c*) и 250 нм (*d*). *b* – увеличенный фрагмент *a*; *d* – увеличенный фрагмент *b*.

апоптоз) клеток головного мозга. Ключевую роль при этом играли клетки нейро-глио-сосудистого микроструктурного комплекса (эндотелиальные клетки, перициты, астроциты), а также олигодендроглиоциты и микроглиоциты. В эндотелиальных клетках и перицитах значительно усиливались проявления трансцитоза (рис. 3).

Существенно то, что микроциркуляторные нарушения и недостаточность дренирующих и санирующих механизмов, из-за отека повреждения части глиальных клеток, сохранялись во всех изученных отделах мозга не только через 1 и 3 сут. реперфузии, но и в более позднем восстановительном периоде (через 7, 14 сут.). Выявили: умеренный отек-набухание отростков астроцитов, сдавливание просвета микрососудов, нарушение проходимости эритроцитов, вакуолизация цитоплазмы эндотелиальных клеток, складки и выросты ламинальной мембраны этих клеток, признаки тромбообразования (агрегация тромбоцитов) в просвете сосудов (рис. 3, *a, b*). При этом нами отмечено большое количество микрососудов с мощными разветвленными отростками перицитов (рис. 3, *a, b*) и структурными признаками активации процессов трансцитоза (кавеолы, простые и клапированные везикулы) в перицитах и эндотелиальных клетках (рис. 3, *c, d*).

Таким образом, установили, что восстановительный период после окклюзии сонных артерий протекал на фоне вторичной неполной ишемии и сопровождался реактивной, компенсаторной и репаративной реорганизацией нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов.

В более отдаленном постишемическом периоде (21-, 30-е сут.) установили, что в клетках нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов практически исчезали проявления активного трансцитоза, но сохранялись ультраструктурные патологические изменения клеток (в основном скопления продуктов неполной деградации) (рис. 4). Скопления остаточных телец, вторичных лизосом, крупных и мелких вакуолей, неоформленного слоистого материала выявили также в отростках перицитов и астроцитов.

По данным флуоресцентной окраски DAPI, в норме распределение глиальных клеток в нервной ткани зависело от их типа. Астроциты распределялись равномерно, рядом с сосудами (фибриллярные) и нейронами (протоплазматические), олигодендроглиоциты — в местах скопления миелинизированных аксонов, микроглиальные клетки встречались редко. Ядра глиальных клеток имели округлую или овальную форму диаметром 6–8 мкм, эндотелиоцитов и перицитов — вытянутую форму, но ядра эндотелиальных клеток были более плоскими (рис. 5).

Через 3-и и 7-е сут. постишемического периода вокруг кровеносных сосудов и нейронов были выявлены очаговые скопления протоплазматических астроцитов (рис. 2, *e, f*).

tically disappeared in the cells of neuro-glio-vascular microstructural complexes, but ultrastructural pathological changes of cells (mainly accumulations of incomplete degradation products) persisted (Fig. 4). Accumulations of residual bodies, secondary lysosomes, large and small vacuoles, unformed layered material have also been found in pericytes and astrocytes.

According to the fluorescent DAPI staining, the normal distribution of glial cells in neural tissue depended on their type. Astrocytes were distributed evenly, near the vessels (fibrillar) and neurons (protoplasmic), oligodendrogliaocytes were at sites of accumulation of myelinated axons; microglial cells were rare. Glial cell nuclei had a round or oval shape with a diameter of 6–8 μm , endotheliocytes and pericytes had an elongated shape, but the endothelial cell nuclei were flatter (Fig. 5).

Three and seven days after the postischemic period, there were focal clusters of protoplasmic astrocytes around the blood vessels (Fig. 6, *a, b*).

According to our data, pyramidal neurons with glial satellites were detected in the somatosensory cortex (layers III and V), the maximum content (25–45%, represented as 95% confidence interval — 95% CI) was found 14 days after ischemia (Fig. 7, *a, b*). Under the normal conditions, there were 10–15% (95% CI) of such neurons. It should be noted that fourteen days after ischemia, along with the satellites, a large number of pyramidal neurons with a high NSE concentration appeared in the SSC (Fig. 7, *b*).

Using the DAPI staining, we found that there was one SSC pyramidal neuron per 1.6 (1.2;1.7) glial cells, one hippocampal neuron per 0.5 (0.2; 0.7) glial cells, and one AM multipolar neuron per 2.4 (2.1;2.6) glial cells (Table).

After ischemia, the NGI values throughout the recovery period were significant in all studied parts of the brain, but the degree of these changes varied (Table).

In the SSC, the maximum NGI value was reached in 14 days, in the hippocampus and AM maximum values were observed in 7 days after the reperfusion. After the peak increase in NGI (7 and 14 days), its subsequent recovery occurred only in AM (Table).

In the delayed recovery period (21 days later), the total numerical density of stained DAPI nuclei of pyramidal neurons in the SSC was statistically lower than that in the reference group by 31.5% (95% CI: 8.7–55.3%, 100 fields of vision). There were SSC zones with an insignificant 15.0 (8.7–23.5%), moderate 25.0 (16.9–34.7%) and a severe 45.0 (35–55.3%) neuronal deficiency. Similar changes were detected in the hippocampus: the neuronal deficiency was 41.2% (95% CI: 31.5–51.5%) 21 days later. In these parts of the brain, a decrease in the content of free glial cells and satellite cells was observed, but the NGI did not reach the reference level. Neuro-glio-vascular complexes of SSC and hippocampus were reconstructed after reperfusion so that glial cells numbers were in-

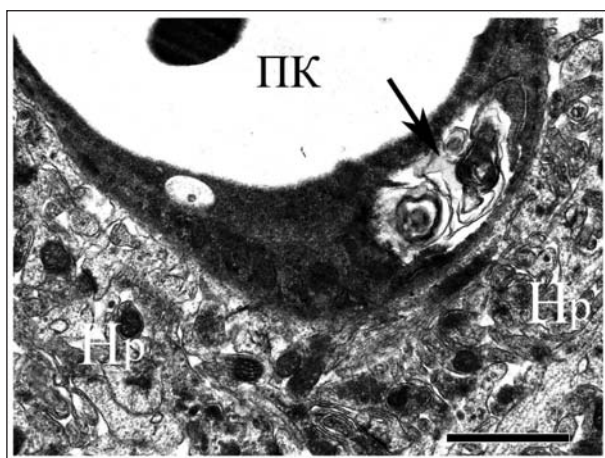


Рис. 4. Электронограмма ультраструктурных остаточных изменений в клетках нейро-глио-сосудистого микроструктурного комплекса гиппокампа белой крысы в отдаленном постшемическом периоде.

Fig. 4. Ultrastructural residual changes in the cells of the neuro-glio-vascular microstructure complex of the white rat hippocampus in the distant postischemic period.

Note. 30 days after — there are accumulations of layered formations in the endothelium (arrow). Нр — a neuropil; ПК — a lumen of a capillary. Staining with uranyl acetate and lead citrate. Magnification $\times 12500$; scale — 2 μm .

Примечание. 30-е сут. — скопления слоистых образований в эндотелиоците (стрелка). Нр — нейропил; ПК — просвет капилляра. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение $\times 12500$; шкала — 2 мкм.

По нашим данным, в соматосенсорной коре (слои III и V) максимальное содержание (25–45%, представлено как 95% доверительный интервал — 95% ДИ) пирамидных нейронов с глиальными сателлитами выявили через 14 сут. после ишемии (рис. 6, a, b). В норме таких нейронов было 10–15% (95% ДИ). Следует отметить, что через 14 сут. после ишемии, наряду с сателлитами, в ССК появлялось большое количество пирамидных нейронов с визуальным высоким содержанием NSE (рис. 6, b).

С помощью окраски DAPI установили, что в норме на один пирамидный нейрон ССК приходилось 1,6 (1,2–1,7, интерквартильный размах), гиппокампа — 0,5 (0,2–0,7), а на один мультиполярный нейрон МТ — 2,4 (2,1–2,6) глиальных клеток (таблица).

После ишемии показатели нейроглиальных отношений (НГИ) в динамике восстановительного периода статистически значимо изменялись во всех изученных отделах головного мозга, но степень этих изменений различалась (таблица).

В ССК максимального значения НГИ, для данного отдела, достигал через 14 сут. гиппокампа и МТ — через 7 сут реперфузии. После увеличения НГИ до максимума (7, 14 сут.) его последующее восстановление происходило только в МТ (таблица).

В отдаленном восстановительном периоде (через 21 сут.) общая численная плотность окра-

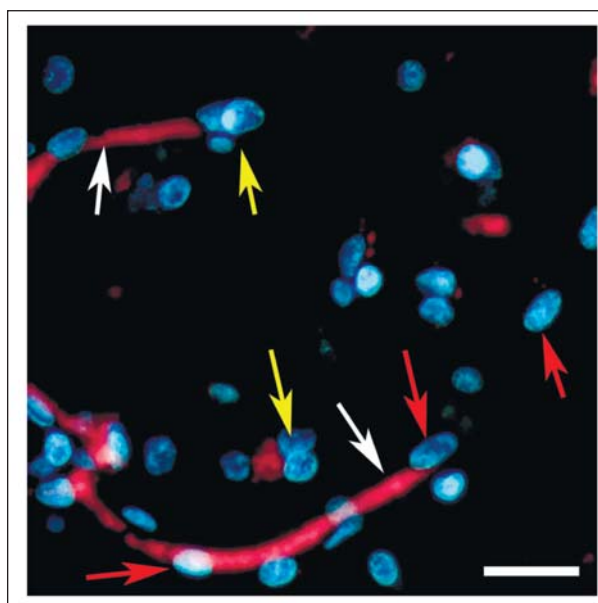


Рис. 5. Молекулярный слой соматосенсорной коры головного мозга белой крысы в норме.

Fig. 5. The molecular layer of the somatosensory cortex of the white rat's brain is normal, fluorescence microscopy.

Note. Yellow arrows — astrocytes (nuclei) are located in small amounts around the vessels; red arrows — endothelial cells and pericytes; white arrows — microspoon lumen. Fluorescent staining of DAPI and immunofluorescence on NSE. NSE is found in red blood cells and serum, so staining on it, in addition to neurons, verifies the vessels of the brain. The increase in lens $\times 40$, scale — 20 μm .

Примечание. Желтые стрелки — астроциты (ядра) в небольшом количестве расположены вокруг сосудов; красные стрелки — эндотелиоциты и перициты; белые стрелки — просвет микрососуда. Флуоресцентная окраска DAPI и иммунофлуоресцентная на NSE. NSE содержится в эритроцитах и сыворотке крови, поэтому окраска на нее кроме нейронов верифицирует сосуды мозга. Объектив $\times 40$, шкала — 20 мкм.

creased. In AM, the neuronal deficiency was only 14.2% (95% CI: 8.0–22.6%) in 21 days, the NGI increased insignificantly and returned to the reference level as early as 14 days after ischemia (Table).

Data demonstrate the reorganization of the neuro-glio-vascular microstructural complexes in the brain neocortex, hippocampus and AM after acute ischemia. According to the literature, such information is of great importance for understanding the fundamentals of structural and functional recovery of the brain after its damage [1–4].

The study of neuro-glio-vascular microstructural complexes was carried out by electronic microscopy and fluorescence staining of nuclear DNA using 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). This compound is able to bind selectively to DNA on the A-T enriched sites, demonstrating bright blue fluorescence with a peak at 461 nm [18, 19]. DAPI reliably verified the nuclei of neurons, glial, endothelial cells and pericytes, i.e. all components of the brain neuro-glio-vascular microstructural complexes.

Data on the organization of neuro-glio-vascular complexes SSC, CA1 hippocampal AM under normal conditions was of particular importance. Due to the

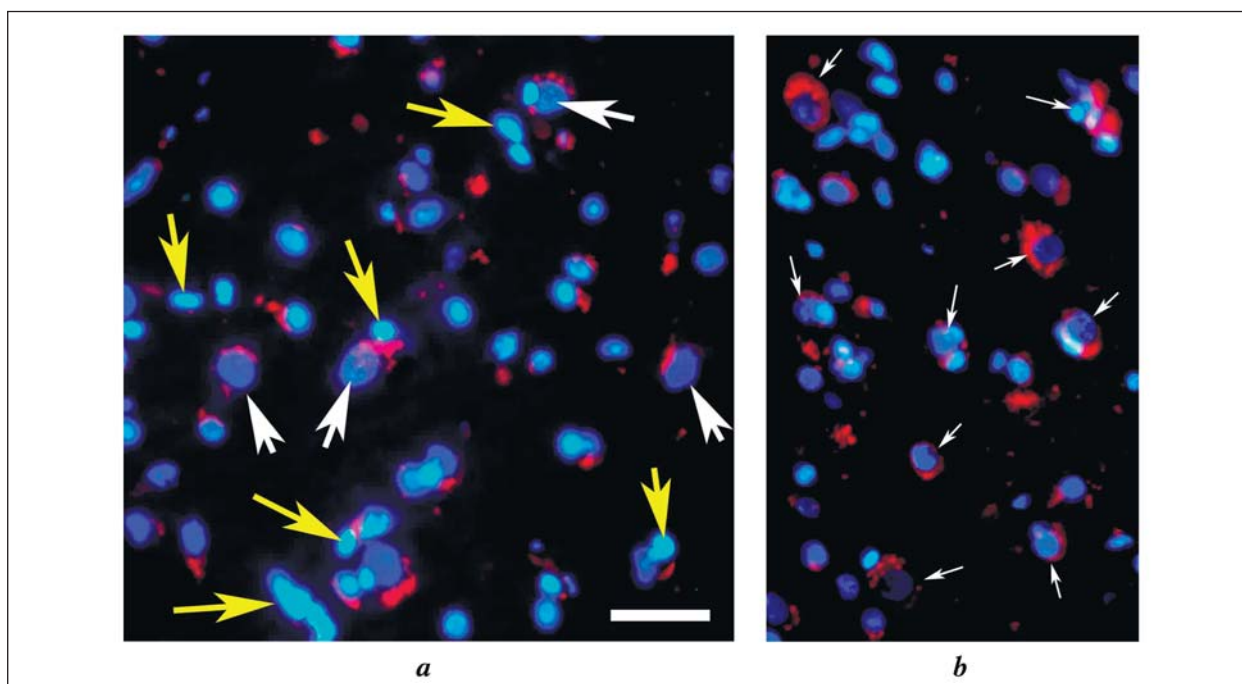


Рис. 6. Флуоресцентная микроскопия слоя V моторной коры головного мозга белой крысы в постшемическом периоде.
Fig. 6. Into the layer V of the motor cortex of the brain of the white rat in the postischemic period, fluorescence microscopy.

Note. 14 days after — *a* — high content of pyramidal neurons (white arrows) with satellite gliocytes (yellow arrows); *b* — pyramidal neurons (white arrow) with hypertrophied pericarion, a large number of NSE fluorescent granules; Clusters of glial cells, satellite cells, there are 1,7 glial cells per 1 neuron. Fluorescent staining of DAPI and immunofluorescent staining on NSE. The Increase in lens $\times 40$, scale — 25 μm .

Примечание. Через 14 сут. *a* — высокое содержание пирамидных нейронов (белые стрелки) с сателлитарными глиоцитами (желтые стрелки); *b* — пирамидные нейроны (белая стрелка) с гипертрофированным перикарионом, большим количеством флуоресцирующих гранул NSE; скопления глиальных клеток, клетки-сателлиты, на 1 нейрон приходится 1,7 глиальных клеток. Флуоресцентная окраска DAPI и иммунофлуоресцентная окраска на NSE. Объектив $\times 40$, шкала — 25 мкм.

шенных DAPI ядер пирамидных нейронов в ССК была статистически ниже контроля, 100% (95% ДИ: 96,4–100%), на 31,5% (95% ДИ: 8,7–55,3%, 100 полей зрения). При этом встречались зоны ССК с незначительным 15,0 (8,7–23,5%), умеренным 25,0 (16,9–34,7%) и выраженным 45,0 (35–55,3%) дефицитом нейронов. Аналогичные изменения выявили в гиппокампе: дефицит нейронов через 21 сут. составил 41,2% (95% ДИ: 31,5–51,5%). В этих отделах мозга уменьшалось содержание свободных глиальных клеток и клеток-сателлитов, но нейроглиальный индекс контрольного уровня не достигал. То есть, нейро-глио-сосудистые комплексы ССК и гиппокампа после реперфузии перестраивались так, что в них происходило увеличение содержание глиальных клеток. В МТ дефицит нейронов через 21 сут. составил только 14,2% (95% ДИ: 8,0–22,6%), НГИ увеличивался незначительно и восстанавливался до уровня контроля уже через 14 сут. после ишемии (таблица).

В настоящем исследовании получены новые данные об однонаправленной реорганизации интегрированных нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов неокортекса, СА1 гиппокампа и МТ головного мозга после острой ишемии. По данным литературы, подобная информация имеет боль-

high neuroglial relations, complexes of AM and SSC had a large compensatory and restorative potential at the baseline (normal conditions). This demonstrated that neurons of neuro-glio-vascular complexes of AM and SSC were in the most favorable conditions during ischemia and immediately after it. The influence of glia on neurons in the postischemic period increased even more. So, 14 days after ischemia, there was one SSC neuron per 3.0–4.8 astrocytes (NGI). According to the literature, these changes contributed to the protection and recovery of damaged neurons [8–10]. In the hippocampus, due to the high density of neurons, positive impact of astrocytes expressed to a lesser extent (NGI: 0.9–1.5). It is likely that this is one of the factors of selective damage of the neurons in the CA1 of hippocampus, as described previously [16].

Data shown that in the early postischemic period manifestations of edema of astrocytes, necrosis and apoptosis of neurons prevailed. At that, processes of transcytosis in pericytes and endothelial cells were activated, and the permeability of the blood brain barrier increased. On this background, the percentage of microvessels with a richly branched processes of pericytes and complexity of the spatial organization of the basal membranes increased. It was evaluated as evidences of compensatory activation of astrocytes and

Нейроглиальные отношения (НГИ) в разных отделах головного мозга белых крыс в норме и после острой ишемии, Me (Ql–Qu)**Neuroglial relations (NGI) in different parts of the brain of white rats in norm and after acute ischemia, Me (Ql–Qu)**

Indexes	Values of indexes for parts of the brain			ANOVA Friedman ($d_f=2$)
	SSC	Hippocampus	Amygdala	
Control ($n=5$)	1.6 (1.3–1.7)	0.5 (0.2–0.7)*	2.4 (2.1–2.6)**	$\chi^2=26.5$; $P=0.0001$
Postischemic period, days ($n=30$)				
1 st	1.5 (1.2–2.0)	0.6 (0.3–0.8)*	2.3 (1.9–2.7)**	$\chi^2=24.8$; $P=0.0001$
3 ^d	1.8 (1.4–2.1)##	1.1 (0.7–1.2)*,##	2.5 (2.1–2.6)**	$\chi^2=20.4$; $P=0.001$
7 th	2.4 (1.8–2.5)###	1.4 (0.9–1.5)*,##	2.9 (2.4–3.2)*,###	$\chi^2=18.6$; $P=0.01$
14 th	3.2 (3.0–4.8)###	1.2 (0.8–1.3)*,##	2.6 (2.1–2.7)*,###	$\chi^2=24.3$; $P=0.0001$
21 th	2.2 (1.6–2.4)###	1.1 (0.6–1.4)*,##	2.2 (1.7–2.5)*,###	$\chi^2=14.6$; $P=0.02$
30 th	2.1 (1.7–2.3)##	0.8 (0.4–1.1)*,##	2.3 (2.0–2.7)**	$\chi^2=16.6$; $P=0.01$
ANOVA ($d_f=5$)	$H=38.4$; $P=0.0001$	$H=22.5$; $P=0.001$	$H=12.4$; $P=0.02$	–

Note. NGI is the neuroglial index. The material is represented as the median (*Me*), the lower (*Ql*), and the upper (*Qu*) quartiles. SSC – somatosensory cortex. * – Differences in comparison with SSC; ** – with hippocampus (Wilcoxon test); # – with previous term; ## – with control (Mann–Whitney test) are statistically significant at $P<0.05$. ANOVA – one-way variance analysis; H – Kruskal–Wallis criterion; χ^2 – Pearson's criterion. The zero hypothesis for ANOVA was rejected at $P<0.05$.

Примечание. НГИ – нейроглиальный индекс. Материал представлен как медиана (*Me*), нижний (*Ql*) и верхний (*Qu*) квантили. Indexes – показатели; Values ... for parts of the brain – значения в отделах мозга; SSC – соматосенсорная кора; Hippocampus – гиппокамп; Amygdala – миндалевидное тело; Postischemic period, days – постиншемический период, дни. * – различия в сравнении с SSC; ** – с гиппокампом (критерий Вилкоксона); # – с предыдущим сроком; ## – с контролем (критерий Манна–Уитни) статистически значимы при $p<0.05$. ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ; H – критерий Краскела–Уоллиса (K–U); χ^2 – критерий Пирсона. Нулевая гипотеза при ANOVA отвергалась при $p<0.05$.

шое значение для понимания основ защиты и восстановления головного мозга при реперфузии [1–4].

Изучение нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов мы проводили с помощью электронной микроскопии и флуоресцентной окраски ядерной ДНК 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI). Это соединение селективно связывалось с ДНК на А–Т обогащенных участках, демонстрируя яркую синюю флуоресценцию с максимумом на 461 нм [18, 19]. DAPI надежно верифицировал ядра нейронов, глиальных, эндотелиальных клеток и перицитов – всех составляющих нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов головного мозга.

Особое значение имели данные об особенностях организации нейро-глио-сосудистых комплексов ССК, СА1 гиппокампа и МТ в норме. За счет высокого нейроглиального отношения комплексы МТ и ССК изначально (в норме) обладали большим компенсаторным и восстановительным потенциалом. Это свидетельствовало о том, что при ишемии и сразу после нее в наиболее выгодных условиях находились нейроны нейро-глио-сосудистых комплексов МК и ССК. Еще больше усиливалось влияние нейроглии на нейроны в постиншемическом периоде. Так, через 14 сут. после ишемии на один нейрон ССК приходилось 3,0–4,8 астроцитов (НГИ). По литературным данным, подобные изменения способствовали защите и восстановлению поврежденных нейронов [8–10]. В гиппокампе, из-за высокой плотности нейронов, позитивное влияние на них астроцитов выражено в меньшей степени (НГИ: 0,9–1,5). Вполне вероятно, что это является одним из факторов, описанной ранее [16], селективной повреждаемости части нейронов СА1 гиппокампа.

Нами установлено, что в раннем постиншемическом периоде преобладали проявления отека, набухания астроцитов, некроза и апоптоза нейро-

angiogenesis [12, 13]. Similar results on possibility of neoangiogenesis were obtained in the study of neuro-glio-vascular complexes in other models of acute ischemia [8–10, 12, 14].

Currently there is a large number of works, indicating the existence of functionally specific, complex, integrated cellular systems. These include neuro-glio-vascular microstructure complexes in the brain. They provide protection of neurons and recovery of nervous tissue after damage. Research in this direction is promising and has a practical value [3–8].

Conclusion

Data confirm multiple adaptive and compensatory alterations within the neuro-glio-vascular complexes of SSC, CA1 of the hippocampus and amygdala of white rat's brain after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries. Patterns demonstrating protection and recovery of damaged neurons were most commonly observed in the SSC and amygdala that both exhibited high NGI value.

нов. При этом активировались процессы транзитоза в перицитах и эндотелиальных клетках, увеличивалась проницаемость гематоэнцефалического барьера. На этом фоне увеличивалась доля микрососудов с мощными разветвленными отростками перицитов, усложнением пространственной организации базальных мембран, что свидетельствовало о компенсаторной активации астроцитов и процессов ангиогенеза [12, 13]. Аналогичные результаты, о возможности неоангиогенеза, были получены при изучении нейро-глио-сосудистых комплексов на других моделях острой ишемии [8–10, 12, 14].

В настоящее время появляется большое количество работ, свидетельствующих о существовании сложных функционально специализированных интегрированных клеточных систем. Именно такими являются нейро-глио-сосудистые микро-структурные комплексы головного мозга. Они обеспечивают защиту нейронов и восстановление нервной ткани после повреждения. Исследования в этом направлении перспективны и имеют практическое значение [3–8].

Литература

1. Васильев Ю.Г., Чучков В.М. Нейро-глио-сосудистые отношения в центральной нервной системе (морфологическое исследование с элементами морфометрического и математического анализа). Ижевск: АНК; 2003: 164.
2. Кузин А.В., Васильев Ю.Г., Чучков В.М., Шорохова Т.Г. Ансамблевые взаимодействия в центральной нервной системе. Ижевск, Берлин: АНК; 2004: 160.
3. Wolburg H., Noell S., Mack A., Wolburg-Buchholz K., Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 2009; 335 (1): 75-96. DOI: 10.1007/s00441-008-0658-9. PMID: 18633647
4. Nakagawa S., Deli M.A., Nakao S., Honda M., Hayashi K., Nakaoko R., Kataoka Y., Niwa M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol. Neurobiol.* 2007; 27 (6): 687-694. DOI: 10.1007/s10571-007-9195-4. PMID: 17823866
5. Острова И.В., Аверущенко М.Ш. Экспрессия мозгового нейротрофического фактора (BDNF) повышает устойчивость нейронов к гибели в постреанимационном периоде. *Общая реаниматология.* 2015; 11 (3): 45-53. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-3-45-53
6. Аверущенко М.Ш., Острова И.В. Значение основного фактора роста фибробластов (BFGF) в развитии постреанимационных изменений популяции клеток Пуркинже мозжечка. *Общая реаниматология.* 2016; 12 (1): 8-15. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-1-8-15
7. Nakagawa S., Deli M.A., Kawaguchi H., Shimizudani T., Shimono T., Kittel A., Tanaka K., Niwa M. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem. Int.* 2009; 54 (3-4): 253-263. DOI: 10.1016/j.neuint.2008.12.002. PMID: 19111869
8. Liu S., Agalliu D., Yu C., Fisher M. The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke. *Curr. Pharm. Des.* 2012; 18 (25): 3653-3662. DOI: 10.2174/138161212802002706. PMID: 22574979
9. Nahimey P.C., Reeson P., Brown C.E. Ultrastructural analysis of blood-brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2016; 36 (2): 413-425. DOI: 10.1177/0271678X15608396. PMID: 26661190
10. Cai W., Liu H., Zhao J., Chen L.Y., Chen J., Lu Z., Hu X. Pericytes in brain injury and repair after ischemic stroke. *Transl. Stroke Res.* 2017; 8 (2): 107-121. DOI: 10.1007/s12975-016-0504-4. PMID: 27837475
11. Tuma P.L., Hubbard A.L. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.* 2003; 83 (2): 871-932. DOI: 10.1152/physrev.00001.2003. PMID: 12843411
12. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремнина Н.Н., Каяя О.В. Ангиогенез как адаптивный механизм при ишемии. *Бюл. Восточно-сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* 2013; 5: 192-195.
13. Silvestre J.S., Mallat Z., Tedgui A., Levy B.I. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc. Res.* 2008; 78 (2): 242-249. DOI: 10.1093/cvr/cvn027. PMID: 18252762
14. Lossinsky A.S., Shivers R.R. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. *Histol. Histopathol.* 2004; 19 (2): 535-564. DOI: 10.14670/HH-19.535. PMID: 15024715
15. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). 2-е изд. М.: Директ-Медиа; 2014: 499.
16. Hossmann K.A. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology.* 2008; 55 (3): 257-270. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2007.12.004. PMID: 18222496
17. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego (California): Elsevier Academic Press; 2005: 367.
18. Zink D., Sadoni N., Stelzer E. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods.* 2003; 29 (1): 42-50. DOI: 10.1016/S1046-2023(02)00289-X. PMID: 12543070
19. Мыщик А.В., Степанов С.С., Ларионов П.М., Акулинин В.А. Актуальные проблемы изучения структурно-функционального состояния нейронов коры большого мозга человека в постшемическом периоде. *Журн. анатомии и гистопатологии.* 2012; 1 (1): 37-47.

Поступила 08.05.17

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об адапционных и компенсаторных изменениях компонентов нейро-глио-сосудистых комплексов ССК, СА1 гиппокампа и МТ головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. Наиболее полно реализация механизмов защиты и восстановления поврежденных нейронов происходит в ССК и МТ, обладающих высоким НГИ.

References

1. Vasilyev Yu.G., Chuchkov V.M. Neuro-glyo-vascular relations in the central nervous system (morphological study with elements of morphometric and mathematical analysis). Izhevsk: ANK; 2003: 164. [In Russ.]
2. Kuzin A.V., Vasilyev Yu.G., Chuchkov V.M., Shorokhova T.G. Ensemble interactions in the central nervous system. Izhevsk, Berlin: ANK; 2004: 160. [In Russ.]
3. Wolburg H., Noell S., Mack A., Wolburg-Buchholz K., Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 2009; 335 (1): 75-96. DOI: 10.1007/s00441-008-0658-9. PMID: 18633647
4. Nakagawa S., Deli M.A., Nakao S., Honda M., Hayashi K., Nakaoko R., Kataoka Y., Niwa M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol. Neurobiol.* 2007; 27 (6): 687-694. DOI: 10.1007/s10571-007-9195-4. PMID: 17823866
5. Ostrova I.V., Avershchenko M.S. Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) increases the resistance of neurons to death in the postresuscitation period. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2015; 11 (3): 45-53. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-3-45-53. [In Russ., In Engl.]
6. Avershchenko M.S., Ostrova I.V. Significance of Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF) in the development of postresuscitation changes in population of cerebellar Purkinje cells. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2016; 12(1): 8-15. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-1-8-15. [In Russ., In Engl.]
7. Nakagawa S., Deli M.A., Kawaguchi H., Shimizudani T., Shimono T., Kittel A., Tanaka K., Niwa M. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem. Int.* 2009; 54 (3-4): 253-263. DOI: 10.1016/j.neuint.2008.12.002. PMID: 19111869
8. Liu S., Agalliu D., Yu C., Fisher M. The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke. *Curr. Pharm. Des.* 2012; 18 (25): 3653-3662. DOI: 10.2174/138161212802002706. PMID: 22574979
9. Nahimey P.C., Reeson P., Brown C.E. Ultrastructural analysis of blood-brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2016; 36 (2): 413-425. DOI: 10.1177/0271678X15608396. PMID: 26661190
10. Cai W., Liu H., Zhao J., Chen L.Y., Chen J., Lu Z., Hu X. Pericytes in brain injury and repair after ischemic stroke. *Transl. Stroke Res.* 2017; 8 (2): 107-121. DOI: 10.1007/s12975-016-0504-4. PMID: 27837475
11. Tuma P.L., Hubbard A.L. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.* 2003; 83 (2): 871-932. DOI: 10.1152/physrev.00001.2003. PMID: 12843411
12. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremmina N.N., Kanya O.V. Angiogenesis as an adaptive mechanism in ischemia. *Byulleten Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo Tsentra Sibirskogo Otdeleniya Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk.* 2013; 5: 192-195. [In Russ.]
13. Silvestre J.S., Mallat Z., Tedgui A., Levy B.I. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc. Res.* 2008; 78 (2): 242-249. DOI: 10.1093/cvr/cvn027. PMID: 18252762
14. Lossinsky A.S., Shivers R.R. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. *Histol. Histopathol.* 2004; 19 (2): 535-564. DOI: 10.14670/HH-19.535. PMID: 15024715
15. Semchenko V.V., Stepanov S.S., Bogolepov N.N. Synaptic plasticity of the brain (fundamental and applied aspects). 2nd ed. Moscow: Direkt-Media; 2014: 499. [In Russ.]
16. Hossmann K.A. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology.* 2008; 55 (3): 257-270. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2007.12.004. PMID: 18222496
17. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego (California): Elsevier Academic Press; 2005: 367.
18. Zink D., Sadoni N., Stelzer E. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods.* 2003; 29 (1): 42-50. DOI: 10.1016/S1046-2023(02)00289-X. PMID: 12543070
19. Mytsik A.V., Stepanov S.S., Lariyonov P.M., Akulinin V.A. Actual problems in the study of structural and functional state of neurons in the human cerebral cortex in postischemic period. *Zhurnal Anatomii i Gistopatologii.* 2012; 1 (1): 37-47. [In Russ.]

Received 08.05.17