

Проявление отека-набухания сенсомоторной коры большого мозга крыс в зависимости от длительности окклюзии общих сонных артерий (морфометрическое исследование)

С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин*,
А. Ю. Шоронова, Л. М. Макарьева, М. С. Коржук

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

Relation between the Severity of the Sensorimotor Cortical Edema with Cell Swelling and the Duration of Common Carotid Artery Occlusion in Rats (Morphometric Study)

Sergey S. Stepanov, Dmitry B. Avdeev, Victor A. Akulinin*,
Anastasia Yu. Shoronova, Lyubov M. Makarieva, Mikhail S. Korzhuk

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

Для цитирования: С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин, А. Ю. Шоронова, Л. М. Макарьева, М. С. Коржук. Проявление отека-набухания сенсомоторной коры большого мозга крыс в зависимости от длительности окклюзии общих сонных артерий (морфометрическое исследование). *Общая реаниматология*. 2021; 17 (5): 111–128. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-5-111-128> [На русск. и англ.]

For citation: Sergey S. Stepanov, Dmitry B. Avdeev, Victor A. Akulinin, Anastasia Yu. Shoronova, Lyubov M. Makarieva, Mikhail S. Korzhuk. Relation between the severity of the sensorimotor cortical edema with cell swelling and the duration of common carotid artery occlusion in rats (morphometric study). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2021; 17 (5): 111–128. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-5-111-128> [In Russ. and Engl.]

Резюме

Цель исследования. Изучить структурные изменения и дать морфометрическую характеристику проявлениям отека-набухания сенсомоторной коры (СМК) большого мозга половозрелых белых крыс после окклюзии общих сонных артерий различной продолжительности.

Методы исследования. Острую ишемию моделировали на белых взрослых крысах Wistar путем 20, 30 и 40-мин окклюзии общих сонных артерий (ООСА). Использовали гистологические (окраска гематоксилин-эозином и по Нисслю), иммуногистохимические (NSE, MAP-2, GFAP) и морфометрические методы исследования. Морфометрический анализ осуществляли на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, с помощью плагинов программы ImageJ 1.53 (Find Maxima, Find Foci). Проверку статистических гипотез (непараметрические критерии) проводили в программе Statistica 8.0.

Результаты. В СМК головного мозга белых крыс после 20, 30 и 40-мин ООСА появлялись признаки цитотоксического отека-набухания, развивались очаговые деструктивные и адаптивные изменения нейронов и астроглии. Проявления отека-набухания сохранялись на протяжении всего периода наблюдения (7 сут). Статистически значимо увеличивалась относительная площадь, количество зон отека-набухания и степень их гидратации (яркость пикселей). Через 1 и 3 сут после ООСА часть отростков астроцитов СМК разрушалась. В большей степени страдали субпиальная и периваскулярные зоны. После односторонней 30 мин ООСА развивались слабые и умеренные, а после двусторонней 40 мин ООСА — умеренные и выраженные мелкоочаговые структурно-функциональные изменения СМК с появлением больших зон просветления «пористого» нейропиля, выраженного периваскулярного и перинейронального отека отростков астроцитов. Последнее сочеталось с умеренной редукцией общей численной плотности нейронов.

Заключение. После ООСА в СМК на фоне дистрофических и некробиотических изменений пирамидных нейронов и активации нейроглиальных клеток появлялись признаки отека-набухания. В большей степени это проявлялось через 3 сут после двусторонней 40 мин окклюзии.

Ключевые слова: отек-набухание; острая ишемия; неокортекс; нейроны; астроглия; иммуногистохимия; морфометрия; крысы Wistar

Адрес для корреспонденции:

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

Correspondence to:

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Данная работа выполнена при поддержке ФГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета в рамках подготовки и аттестации научно-педагогических и научных кадров.

Summary

The aim of the study. To examine the changes in structure and morphometry in sensorimotor cortical edema with cell swelling in mature white rats after common carotid artery occlusion of various durations.

Material and methods. Acute ischemia was modeled on white adult Wistar rats by 20-, 30- and 40-min occlusion of the common carotid arteries (CCA). Histological (hematoxylin-eosin and Nissl staining), immunohistochemical (NSE, MAP-2, GFAP) and morphometric methods were used. Morphometry was assessed on hematoxylin and eosin-stained specimens using ImageJ 1.53 plug-ins (Find Maxima, Find Foci). Statistical hypothesis testing (nonparametric criteria) was performed using Statistica 8.0 software.

Results. In the sensorimotor cortex (SMC) of white rats after 20, 30 and 40 minutes of CCA occlusion the signs of cytotoxic brain edema appeared, focal destructive and adaptive changes of neurons and astroglia evolved. The edema persisted throughout the observation period (7 days). The increase in the relative area, the number of cell swelling zones and their hydration (pixel brightness) was significant. On days 1 and 3 after CCA occlusion, some of the SMC astrocyte processes underwent destruction. Subpial and perivascular zones suffered to a greater extent. Mild and moderate (after unilateral 30-min CCA occlusion) to moderate and severe (after bilateral 40-min CCA occlusion) scattered structural and functional changes of the SMC with large areas of clearing in the «porous» neuropil, severe perivascular and perineuronal edema of the astrocyte processes developed. The latter was associated with a moderate reduction of the total neuronal density.

Conclusion. After occlusion of CCA, signs of edema with cellular swelling appeared in the SMC amid dystrophic and necrotic pyramidal neurons and activated neuroglial cells. To a greater extent, the signs of brain swelling were evident three days after bilateral 40-min occlusion of CCA.

Keywords: brain edema; acute ischemia; neocortex; neurons; astroglia; immunohistochemistry; morphometry, Wistar rats

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

Acknowledgements. This research was supported by the Omsk State Medical University as part of the training and certification of the academic staff program.

DOI:10.15360/1813-9779-2021-5-111-128

Введение

Цитотоксический отек-набухание головного мозга возникает при отравлении или гипоксии в результате нарушения клеточного метаболизма, удержания в клетках натрия и воды [1–4]. В большинстве случаев эти процессы обратимы. Связанный с гипоксией цитотоксический отек мозга наблюдается, например, при локальной и тотальной острой ишемии, черепно-мозговой травме [4]. Патогенетические механизмы и структурные проявления отека-набухания при ишемии хорошо изучены. Существует тенденция рассматривать отек и набухание как взаимосвязанные проявления дисфункции водно-электролитного обмена, заканчивающиеся либо необратимой гидропической дистрофией, либо восстановлением водно-ионного баланса и гидратации клеточных белков. Тем не менее, отек — это, прежде всего, скопление жидкости в межклеточных пространствах мозга (свободная жидкость). Набухание считается самостоятельным процессом, имеющим в основе прочное связывание интраструктуральной воды с внутриклеточными биocolлоидами [4–8].

Принципиальным механизмом цитотоксического отека-набухания является распро-

Introduction

Cytotoxic cerebral edema occurs in poisoning or hypoxia as a result of cellular metabolic disorders and sodium and water retention in cells [1–4]. In most cases these processes are reversible. Cytotoxic brain edema associated with hypoxia occurs, for example, in local and total acute ischemia, traumatic brain injury [4]. The pathogenetic mechanisms and structural manifestations of cerebral edema with swelling in ischemia are well studied. There is a tendency to consider edema and swelling as interrelated manifestations of water-electrolyte imbalance, ending either in irreversible hydroptic dystrophy or in restored water-ion balance and hydration of cellular proteins. However, edema is primarily an accumulation of fluid in the intercellular spaces of the brain (free fluid). Swelling is considered to be an independent process with underlying strong binding of the fluid contained in the cellular structures to intracellular biocolloids [4–8].

The main mechanism of cytotoxic edema is spreading depolarization (SD), which is a wave of electrophysiological hyperactivity associated with excitotoxicity of glutamate. Abnormally prolonged SD is a prerequisite for the development of acute cortical lesions. At the same time, SD and cytotoxic edema with swelling largely coincide in terms of lo-

страняющаяся деполяризация (РД) — волна электрофизиологической гиперактивности, связанная с эксцитотоксичностью глутамата. Патологически длительные РД являются необходимым механизмом развития острого поражения коры головного мозга. При этом РД и цитотоксический отек-набухание в значительной степени совпадают по локализации и времени регистрации. РД/отек — это изначально обратимое токсическое состояние, которое, однако, при превышении критических значений приводит к гибели клеток (нейронов, астроцитов, олигодендроцитов). Наиболее распространенной причиной РД/отека является ишемический инсульт. Кратковременные эпизоды РД/отека рассматриваются как относительно безвредные события и регистрируются в мозге контрольных животных. [9, 10].

Острое набухание нейронов характеризуется увеличением его размеров, растворением нуклеопротеиновых комплексов (хроматофильное вещество Ниссля), гиперхромией и смещением ядра нейрона. Дальнейшие гидropические изменения нейронов сопровождаются появлением светлых пространств или вакуолей, прозрачной цитоплазмы. Необратимая гидropическая дистрофия сопровождается сохранением ядра, но полным разрушением цитоплазматических оргanelл [11, 12].

Функционирование, восстановление и гибель нейронов происходит в едином комплексе с астроцитами и микрососудами [13–16]. После острой ишемии дальнейшая судьба нейроглиального комплекса окончательно определяется в течение 24–48 ч. В случае неблагоприятного исхода деструкции подвергаются некробиотически измененные нейроны и связанные с ними отростки астроцитов [12]. Ключевую роль в развитии отека-набухания играет аквапорин-4 [4, 8].

В течение первых 6 ч после начала инсульта повреждение ишемических клеток незаметно и его трудно распознать под микроскопом. Критический порог мозгового кровотока для развития необратимого повреждения составляет ~15 мл/100 г×мин. Ниже этого порога ишемизированная ткань мозга поглощает воду в случае любого остаточного капиллярного потока (ионный отек). Далее развивается типичный цитотоксический отек-набухание [17]. Развитие отека-набухания сопровождается линейным увеличением в тканях содержания воды и может быть зафиксировано физическими (КТБ МРТ), гистологическими и иммуногистохимическими методами изучения нервной системы [17, 18].

Гибель нейронов приводит к высвобождению таких факторов, как связанные с повреждением молекулярные паттерны (DAMPs), которые вызывают воспаление в поврежден-

calization and time of registration. SD/edema is initially a reversible toxic condition, which, however, leads to death of cells (neurons, astrocytes, oligodendrocytes) when exceeding critical values. The most common cause of SD/edema is ischemic stroke. Brief episodes of SD/edema are considered to be relatively harmless and can be recorded in the brains of control animals [9, 10].

Acute neuronal swelling is characterized by an increase in the cellular size, dissolution of nucleoprotein complexes (Nissl chromatophilic substance), hyperchromia, and displacement of the neuronal nucleus. Further hydropic neuronal changes are associated with clearing areas or vacuoles as well as transparent cytoplasm. Irreversible hydropic dystrophy associates with preserved nucleus but completely destructed cytoplasmic organelles [11, 12].

Neuronal functioning, recovery and death occur together with astrocytes and microvessels [13–16]. After acute ischemia, the further fate of neuroglial complex is ultimately determined within 24–48 h. In case of unfavorable outcome, necrobiotic neurons and associated astrocyte processes undergo destruction [12]. Aquaporin-4 plays a key role in the development of this edema-associated swelling [4, 8].

During the first 6 h after stroke onset, ischemic cell damage is subtle and difficult to recognize under a microscope. The critical threshold of cerebral blood flow for the development of irreversible damage is about 15 ml/100 g×min. Below this threshold, ischemic brain tissue absorbs water if any residual capillary flow occurs (ionic edema). Then a typical cytotoxic cerebral edema with swelling develops [17]. The latter is accompanied by a linear increase in tissue fluid content and can be recorded by imaging (CT or MRI), histological and immunohistochemical methods [17, 18].

Neuronal death also leads to the release of factors such as damage-associated molecular patterns (DAMPs), which initiate inflammation in the damaged area of the brain. This exacerbates damage to the blood-brain barrier, microvascular failure, brain edema, oxidative stress, and directly induces neuronal death. The developing global brain inflammation can trigger secondary delayed pathological changes and affect long-term neurological outcome. Thus, the development of brain edema with cell swelling correlates with global brain inflammation and, consequently, with its microglial system [19].

However, it is unknown how the development of brain edema is affected by the duration of the mild ischemia period. Also, it is still unclear which changes in the upper cortex initiate neurodegenerative processes of the underlying neurons and which are predominantly protective through reduced ascending nonspecific activation.

Thus, the hypothesis of the role of brain edema with cell swelling in nerve tissue protection

ной области мозга. Это усугубляет повреждение гематоэнцефалического барьера, микросудистую недостаточность, отек мозга, окислительный стресс и непосредственно вызывает гибель нейронов. Развивающееся глобальное воспаление мозга может формировать вторичные отсроченные патологические изменения и влиять на долгосрочный неврологический исход. Таким образом, развитие отека-набухания коррелирует с глобальным воспалением головного мозга, а, следовательно, с его микроглиоцитарной системой [19].

Однако неизвестно, как на развитие отека-набухания влияет продолжительность периода слабой ишемии и при каких изменениях верхних отделов коры начинаются нейродегенеративные процессы нижележащих нейронов, а при каких происходит преимущественно защита в результате уменьшения восходящей неспецифической активации.

Таким образом, гипотеза о роли отека-набухания в защите нервной ткани имеет право на существование. Поэтому необходимы дальнейшие исследования в этом направлении. В настоящей работе проведено сравнительное гистологическое и морфометрическое исследование проявлений отека-набухания в СМК головного мозга половозрелых белых крыс в норме и после 20, 30 и 40 мин окклюзии общих сонных артерий.

Материал и методы

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическими комитетами вуза (протокол № 83 от 14 октября 2016 г.; протокол № 107 от 2 октября 2018 г.). Использовали аутбредных половозрелых крыс стока Wistar (самцы масса 270–350 гр.). Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, эксперимент 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».

Острую неполную ишемию головного мозга моделировали путем 20 (группа I, $n=24$), 40 мин (группа III, $n=24$) двусторонней и 30 мин (группа II, $n=24$) односторонней окклюзии общих сонных артерий (ООСА) без гипотонии. Эксперимент проводили под наркозом: Zoletil 100 (5–7 единиц). Контролем служили интактные крысы ($n=6$). Через 1, 3 и 7 сут после ООСА ($n=54$, по 6 крыс на срок) мозг фиксировали перфузией последовательным введением 100–125 мл раствора 0,9% NaCl и Фрагмина (5000 единиц) и 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Полученный материал с помощью автомата «STP 120» заключали в го-

may be valid. Therefore, further research in this direction is necessary. In this study a comparative histological and morphometric examination of brain edema manifestations in the SMC of mature white rats before and after 20, 30 and 40 min occlusion of the common carotid arteries was performed.

Materials and Methods

The study was performed at the Omsk State Medical University; it had been approved by the ethical committees of the university (Protocol 83, October 14, 2016; Protocol 107, October 2, 2018). Outbred sexually mature Wistar rats (males weighing 270–350 g) were used. Animals were kept in standard laboratory conditions, the experiment was carried out according to the «Rules of work with experimental animals» (Appendix to the order of the Ministry of Health of the USSR from 12.08.77 No.755) and with the International Council for Laboratory Animal Science guidelines, supported by WHO, the directive of the European Parliament No. 2010/63/EU from 22.09.10 «On protection of animals used for scientific purposes».

Acute incomplete cerebral ischemia was simulated by 20 min (group 1, $n=24$), 40 min (group 3, $n=24$) bilateral and 30 min (group 2, $n=24$) unilateral common carotid artery (CCA) occlusion without hypotension. The experiment was performed under anesthesia by Zoletil 100 (tiletamine-zolazepam) (5–7 units). Intact rats ($n=6$) served as a control. On days 1, 3, and 7 after CCA occlusion ($n=54$, 6 rats per time period) the brains were perfusion-fixed by sequential injections of 100–125 ml of 0.9% NaCl solution and sodium dalteparin (5000 IU) and 30 ml of 4% paraformaldehyde solution on phosphate buffer (pH 7.2–7.4). The obtained material was embedded in homogenized paraffin (HISTOMIX®) using an STP 120 machine. Serial frontal sections (4 μ m thickness) were prepared using an HM 450 microtome (Thermo) at the level of the sensorimotor cortex (SMC) [20]. Manipulations related to material sampling were performed under Zoletil 100 anesthesia.

Cell identification (neuron/glia) of SMC was performed on Nissl and hematoxylin and eosin stained preparations, as well as using immunohistochemical typing of NSE, MAP-2 (neurons), and GFAP (astrocytes). The cytoskeleton of neurons (bodies and processes) was studied using the MAP-2 reaction, the cytoskeleton of astrocytes by the GFAP reaction. NSE, MAP-2, and GFAP reactions were used only for typing and localization of the corresponding structures by specific proteins. The total neuronal and glial cell densities (counts per 1 mm²) in layers III and V of the SMC were estimated on Nissl-stained preparations; only sections with a visible neuronal nucleus were included to ensure consistency.

Poly- and monoclonal antibodies were used for immunohistochemical study. They included NSE (RAA537Ra01, rabbit polyclonal antibodies to rat antigen with 5–20 μ g/ml dilution, Cloud-Clone Corp.), MAP-2 (ab32454, rabbit polyclonal antibody, with 1 μ g/ml dilution, Abcam, USA), and GFAP (PA0026, murine monoclonal antibody, GA5 clone, ready-to-use, Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK).

The immunohistochemical reactions were performed on sections placed on polylysine-coated slides. After reaction with primary antibodies, the sections were incubated with appropriate secondary antibodies, DAB

могенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы (толщина 4 мкм) готовили с помощью микротомы HM 450 (Thermo) на уровне сенсомоторной коры (СМК) [20]. Манипуляции, связанные с забором материала, проводили под наркозом Zoletil 100.

Идентификацию клеток (нейрон/глия) СМК проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, по Нисслию, а также при иммуногистохимическом типировании NSE, MAP-2 (нейроны) и GFAP (астроциты). Цитоскелет нейронов (тела и отростки) изучали с помощью реакции на MAP-2, цитоскелет астроцитов — с помощью реакции на GFAP. Реакции NSE, MAP-2 и GFAP использовали только для типирования и определения локализации соответствующих структур по специфическим белкам. Общую численную плотность нейронов и глиальных клеток (пересчет на 1 мм²) в слоях III и V СМК подсчитывали на препаратах, окрашенных по Нисслию; для стандартизации учитывали только срезы нейронов с видимым ядрышком.

Для иммуногистохимического исследования использовали поли- и моноклональные антитела. NSE (PAA537Ra01) — кроличьи поликлональные антитела к крысиному антигену; разведение 5–20 мкг/мл (Cloud-Clone Corp.). MAP-2 (ab32454) — кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (Abcam, США). GFAP (PA0026) — мышьиные моноклональные антитела, клон GA5, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

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

Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (объектив 100, камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4×1,4 μm), изображение сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей). При окраске гематоксилин-эозином для изучения зон (пиков) максимальной яркости (ЗМЯ) на каждый срок отбирали по 30 случайно выбранных полей зрения (каждое 31400 мкм²) СМК. На этих полях зрения выделяли области интереса (ROI) — участки молекулярного слоя размером 20×20 мкм, формировали стеки (100–120 ROI), рассчитывали среднее значение для каждого поля зрения и животного. Далее формировали и сравнивали вариационные ряды по 30 значений на срок. Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.52 s.

Для морфометрического изучения изменений зон максимальной яркости (предположительно проявления отека-набухания) на цветных изображениях использовали плагин-фильтр «Find Maxima» M.Schmid из программы ImageJ 1.53c (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). Предварительно зона интереса (ROI, только

(3,3'-diaminobenzidine) chromogen, stained with hematoxylin, and embedded in polystyrene. A Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd., United Kingdom) universal kit was used for imaging.

The preparations were photographed using a Leica DM 1000 microscope (×100 objective, GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB camera, pixel size 1.4×1.4 μm), and the images were saved as tiff files (2592×1944 pixels). When stained with hematoxylin-eosin, 30 randomly selected visual fields (each 31400 μm²) of SMC were selected for each studied time period to evaluate the maximal brightness zones (MBZ). The areas of the molecular layer sized 2020 μm (regions of interest, ROIs) were selected in these visual fields, stacks (100–120 ROIs each) were formed, and the average values for each visual field and the animal were calculated. Next, ordered series of 30 values per time period were generated and compared. Further morphometric study was performed using ImageJ 1.52c software.

For morphometric study of changes in maximal brightness zones (presumably representing edema with cell swelling) on color images we used plugin-filter «Find Maxima» M.Schmid from the ImageJ 1.53c software (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). The zone of interest (ROI, neuropil only) was preliminarily processed using the algorithm of the «Morphological Filters» plugin from the «MorphoLibJ» package (Radius 1 pix). This allowed morphological segmentation of the study object and consistency of the images. The relative area (S, %) and numerical density (N, per 400 μm²) of MBZ were determined on obtained image masks («Analyze Particles»).

The maximal brightness zones in the neuropil of SMC had different shapes, sizes, and intensity levels (see Fig. 6). Individual assessment of the maximum brightest and largest peaks in the visual field of the neuropil of the SMC molecular layer in groups 1, 2, and 3 was performed using the Find Foci plugin (GDSC ImageJ software package for microscopy image analysis). It allows to classify all the MBZs by size and intensity by calculating, in particular, the «total pixel intensity» which is the MBZ size in pixels multiplied by pixel brightness [21].

According to the literature, 6–8 animals per group, 5–6 serial sections, and 5–10 randomized SMC visual fields (areas of interest) per each section are sufficient to obtain reliable results in a morphological study [22, 23]. In this study, we compared 30 randomized SMC visual fields per time period, which is sufficient to obtain reliable results.

Statistical hypothesis testing was performed using nonparametric criteria (Mann–Whitney *U*-test, ANOVA Kruskal–Wallis test) and correlation analysis (based on χ^2 test) using Statistica 8.0 software (StatSoft). Quantitative data in the study were presented as median (Me, 50% quartile, Q2) and interquartile range (Q1–Q3, or 25–75% quartiles), or percentage (%). Multiple comparisons were performed using Kruskal–Wallis ANOVA [24] test.

Results and Discussion

No structural signs of cytotoxic edema were found in the SMC of the control group animals. Uniform staining of neuropil with eosin prevailed (Fig. 1, *a*) indicating identical fluid content in the

нейропил) подвергалась обработке алгоритмом плагина «Morphological Filters» из пакета «MorphoLibJ» (Radius 1 pix). Это позволяло провести морфологическую сегментацию объекта изучения и стандартизовать изображения. На полученных масках изображений определяли («Analyze Particles») относительную площадь (S, %) и численную плотность (N, на 400 мкм²) ЗМЯ.

ЗМЯ в нейропиле СМК имели разные формы, размеры и степень яркости (см. рис. 6). Индивидуальную оценку максимально ярких и крупных по площади пиков зрения нейропиля молекулярного слоя СМК в группах I, II, III проводили с помощью плагина Find Foci (набор программ GDSC ImageJ анализа изображений для микроскопии). Он позволяет распределить все ЗМЯ по размерам и степени яркости путем вычисления, в частности, интегрального показателя «общая интенсивность пикселей» — произведение размера ЗМЯ в пикселях на яркость пикселей [21].

По литературным данным, для получения значимых результатов в ходе морфологического исследования достаточно 6–8 животных в группе, 5–6 серийных срезов и 5–10 случайных полей зрения СМК (зоны интереса) на каждом срезе [22, 23]. В настоящем исследовании мы сравнивали по 30 рандомизированных полей зрения СМК на срок, что достаточно для получения значимых результатов.

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями (Mann–Whitney *U*-test, ANOVA Kruskal–Wallis) и корреспондентского анализа (соответствий, в основе критерий χ^2) с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft). Количественные данные в исследовании представили как медиану (Me — 50% квартиль, Q2) и интерквартильный разброс (Q1–Q3 — 25–75% квартили), процентную долю (%). Проблему множественного сравнения решали путем использования ANOVA Kruskal–Wallis [24].

Результаты и обсуждение

В СМК животных контрольной группы не выявили структурных проявлений цитотоксического отека-набухания. Преобладало равномерное окрашивание нейропиля эозином (рис. 1, *a*). Это свидетельствовало о том, что в биокolloидах цитоплазмы его составляющих (аксоны, дендриты, синапсы, отростки астроцитов) было примерно одинаковое содержание воды.

Через 1 и 3 сут после ООСА в молекулярном слое СМК происходило формирование «пористого» нейропиля — набухание микроглии и периваскулярной отекаемости сосудов. В III–V слоях наблюдали нейроны с потемневшей цитоплазмой и пикнотические (красные) нейроны с умеренным перичеселлярным отеком, большое количество глиальных клеток (рис. 1, *b, d, e*). Однако в верхнем этаже СМК появлялись GFAP-негативные локальные ишемические зоны или с очень тонкими, прерывистыми отростками астроцитов (рис. 1, *c*). Деструктивные изменения цитоскелета астроцитов преобладали у животных группы III (после 40 мин

cytoplasmic biocolloids of its components (axons, dendrites, synapses, astrocyte processes).

On days 1 and 3 after CCA occlusion, the «porous» neuropil due to swelling of microglia and perivascular edema of vessels occurred in the molecular layer of SMC. Neurons with dark cytoplasm and shrinking (red) neurons with moderate pericellular edema and numerous glial cells were observed in layers III–V (Fig. 1, *b, d, e*). However, GFAP-negative local ischemic zones or areas with very thin intermittent astrocytic processes appeared in the upper SMC level (Fig. 1, *c*). Destructive changes in the astrocytic cytoskeleton predominated in group 3 animals (after 40 min of occlusion). On day 7 after CCA occlusion, GFAP-negative zones in SMC were barely visible; regeneration and hypertrophy of astrocytic processes were observed indicating moderate reactive astrogliosis (Fig. 1, *f*). Thus, on day 3 following 40 min CCA occlusion, the neuroglial index of the SMC increased from 1.62 (1.53–1.81) to 2.72 (2.48–3.10) (median; Mann–Whitney *U*-test; $P=0.001$).

Hydropic alterations and lucent structures (astrocyte processes, terminals, distal dendrites) predominated in the neuropil, but neurons with distinct perikaryon vacuolization were also encountered (Fig. 2). Dendrite and neuropil vacuolization was easily verified by immunohistochemical typing of NSE, MAP-2, and GFAP (Fig. 3, *a, b, c*). Astrocyte bodies (8–10 μm) and their processes were displayed as a network filling the space between the SMC perikaryons (Fig. 3, *c*). Some of the processes showed signs of swelling (Fig. 2).

Compared to the control after CCA occlusion, all experimental groups revealed a significant decrease in the total numerical density of neurons in layers III and V of the SMC. Thus, in group 3 on day 7 post occlusion, this parameter in layer III decreased by 26.4% ($P=0.001$), with a normal value of 442 (352–485), and in layer V by 18.5% ($P=0.01$), with a normal value of 290 (244–331) per 1 mm² (Mann–Whitney *U*-test). At the same time, multiple comparisons showed intergroup differences ($H=9.7$; $P=0.02$; Kruskal–Wallis one-way analysis of variance). Compared to group 3, the smallest reduction in the total numerical density of neurons was noted in animals with unilateral CCA occlusion (group 2): in layer III it was 16.5% ($P=0.001$), while in layer V it was 9.2% ($P=0.01$; Mann–Whitney *U*-test). However, no differences were found between groups 1 and 3 for this parameter ($P>0.05$; Mann–Whitney *U*-test). Consequently, on day 7 after reperfusion, bilateral CCA occlusion resulted in more severe impact on the population of pyramidal neurons in layers III and V of the SMC.

Hence, the histological and immunohistochemical alterations found in the SMC were indicative of varying impact of 20, 30 and 40 min CCA occlusion on SMC neurons. Similar diffuse and focal

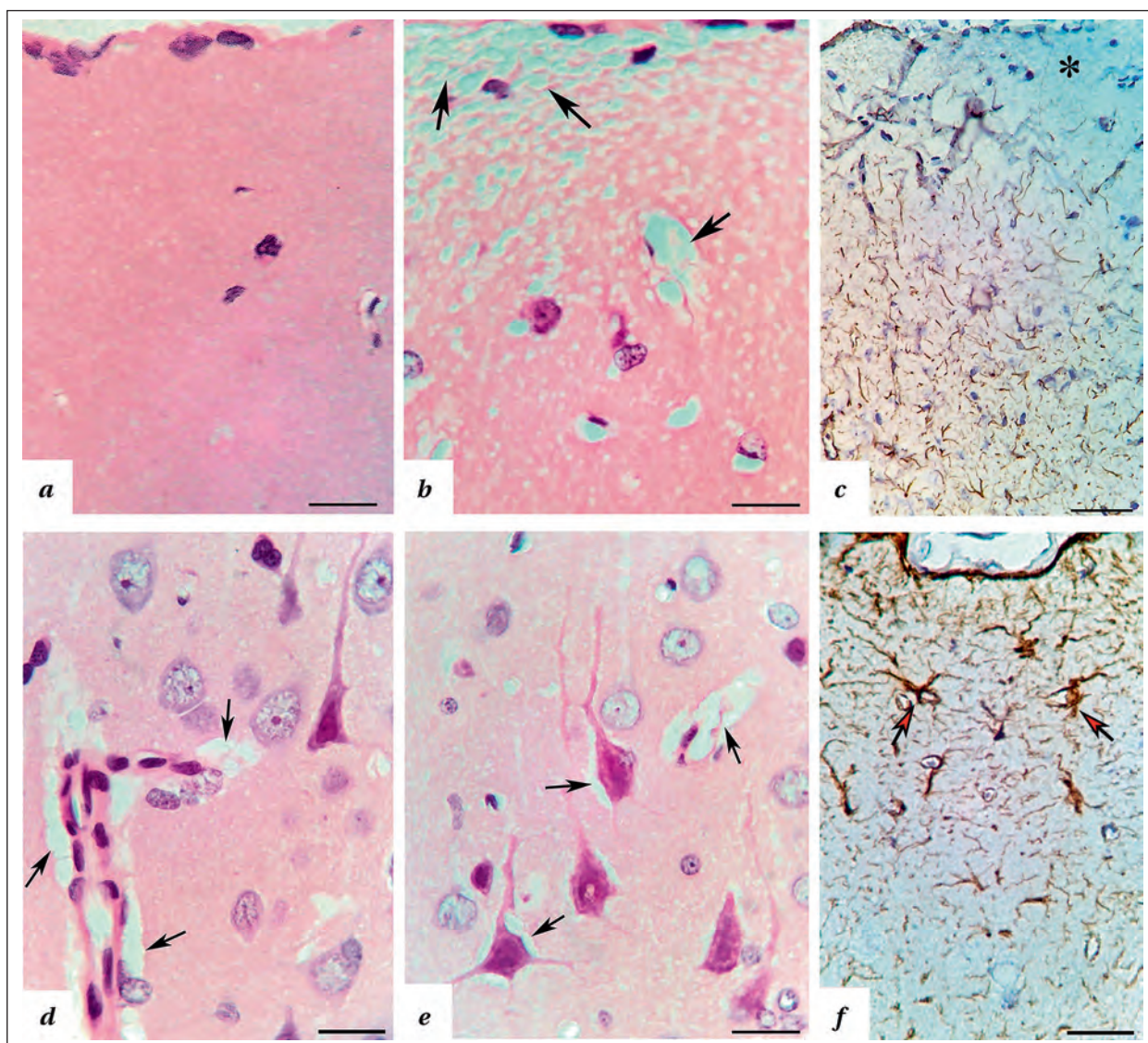


Рис. 1. Фрагменты СМК головного мозга белых крыс в норме (а) и постинсультном периоде (группа III; б, с, д, е, ф).
Fig. 1. Fragments of white rat brain SMC in normal (a) and postischemic period (group 3; b, c, d, e, f).

Note. No vacuolization of the molecular layer neuropil in normal SMC (a); vacuolization of the neuropil (arrows), perivascular and perikaryonic edema of astrocytic processes (arrows), hyperchromia and shrinkage of perikarya (red neurons); large number of glial cells (b, d, e); area of destruction (*) of astrocytic processes (c, day 1); astrocytic hyperplasia (f, day 7, arrows). Hematoxylin-eosin staining (a, b, d, e), GFAP immunohistochemical typing (c, f). $\times 100$ magnification; $20\ \mu\text{m}$ scale (a, b, d-f); $\times 40$ magnification; $50\ \mu\text{m}$ scale (c).

Примечание. Отсутствие вакуолизации нейропиля молекулярного слоя в норме (а); вакуолизация нейропиля (стрелки), периваскулярный и перикариональный отек астроцитарных отростков (стрелки), гиперхромия и сморщивания перикарионов (красные нейроны); большое количество глиальных клеток (b, d, e); зона деструкции (*) отростков астроцитов (с, 1 сут); гиперплазия астроцитов (f, 7 сут, стрелки). Окраска гематоксилин-эозином (a, b, d, e), иммуногистохимическое типирование GFAP (c, f). Объектив $\times 100$; шкала — $20\ \mu\text{м}$ (a, b, d-f); объектив $\times 40$; шкала — $50\ \mu\text{м}$ (c).

окклюзии). Через 7 сут после ООСА GFAP-негативные зоны в СМК практически не встречались, происходило восстановление и гипертрофия астроцитарных отростков — умеренные проявления реактивного астроглиоза (рис. 1, ф). Так, через 3 сут после 40 мин ООСА нейроглиальный индекс СМК увеличивался от 1,62 (1,53–1,81) до 2,72 (2,48–3,10) (медиана; Mann-Whitney *U*-test; $p=0,001$).

Гидропические изменения, с просветлением структур, преобладали в нейропиле (отростки астроцитов, терминали, дистальные денд-

changes have been described in superficial SMC damage by other authors [25] and previously by the authors of this paper [14].

To compare the severity of SMC edema in the studied groups we used the analysis of color images of neuropil areas of the same size (20×20 microns) without microvessels by assessing their pixel properties (brightness, number). Bright pixels (against the darker background) corresponded to the areas of SMC with high water content and were considered the maximum brightness zones. We found that on day 1 after CCA occlusion in all groups, the rel-

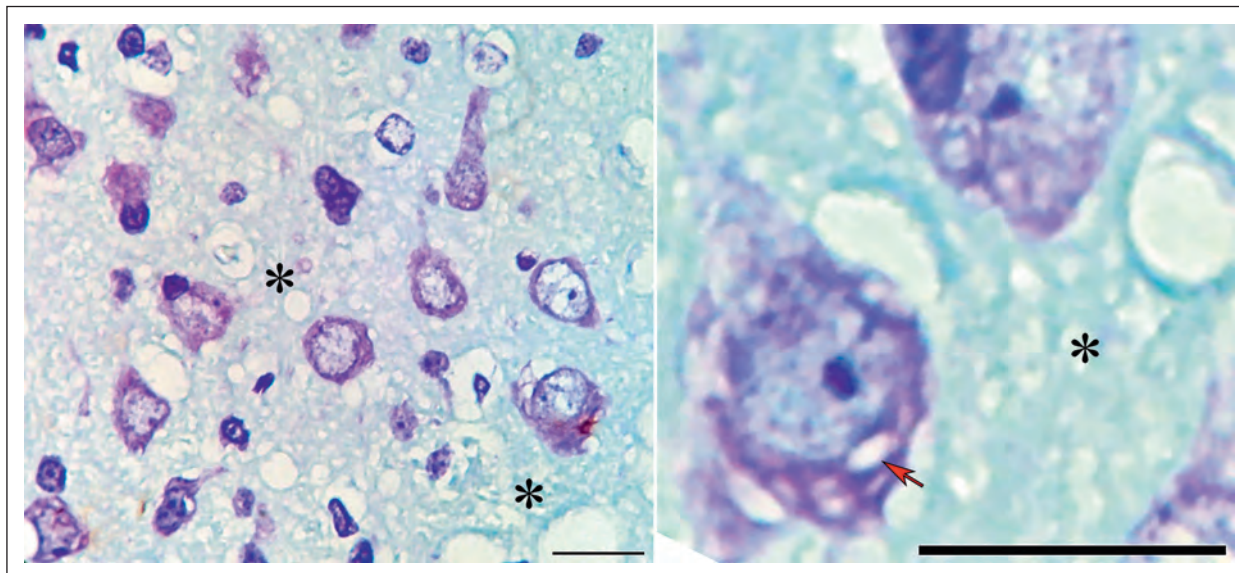


Рис. 2. Фрагменты СМК головного мозга белых крыс в постшемическом периоде (группа III, 3 сут).

Fig. 2. Fragments of the brain SMC of white rats in the postischemic period (group 3, day 3).

Note. Vacuolization of the neuropil (*) and perikaryon (arrow), edema of perikaryon of astrocytic processes. Nissl staining. $\times 100$ magnification; 20 μm scale.

Примечание. Вакуолизация нейропиля (*) и перикариона (стрелка), перикариональный отек астроцитарных отростков. Окраска по Ниссли. Объектив $\times 100$; шкала — 20 мкм.

риты), но встречались нейроны с явными признаками вакуолизации перикариона (рис. 2). Вакуолизация дендритов и нейропиля хорошо верифицировалась при иммуногистохимическом типировании NSE, MAP-2 и GFAP (рис. 3, a, b, c). Тела астроцитов (8–10 мкм) и их отростки были представлены в виде сети, которая заполняла пространство между перикарионами СМК (рис. 3, c). Часть отростков имела признаки набухания (рис. 2).

В сравнении с контролем после ООСА во всех экспериментальных группах выявили статистически значимое уменьшение общей численной плотности нейронов слоя III и V СМК. Так, в группе III через 7 сут наблюдения в слоя III этот показатель уменьшался на 26,4% ($p=0,001$), в норме — 442 (352–485), а слое V — на 18,5% ($p=0,01$), в норме 290 (244–331) на 1 мм² (Mann–Whitney U -test). При этом множественное сравнение показало наличие межгрупповых различий ($H=9,7$; $p=0,02$; Kruskal–Wallis one-way analysis of variance). В сравнении с группой III наименьшую редукцию общей численной плотности нейронов отметили у животных с односторонней ООСА (группа II): в слое III — на 16,5% ($p=0,001$), V — на 9,2% ($p=0,01$; Mann–Whitney U -test). Однако, различий между группами I и III по этому показателю не выявили ($p>0,05$; Mann–Whitney U -test). Следовательно, через 7 сут после реперфузии двусторонняя ООСА имела более тяжелые последствия для популяции пирамидных нейронов слоев III и V СМК.

ative area of maximum brightness zones (median) was 2–2.5 times higher than the control values. Multivariate testing for equality of medians of this parameter revealed significant differences between the samples of groups 1–3 on day 1 ($H=37.8$; $P=0.0001$), day 3 ($H=26.6$; $P=0.0001$), and day 7 ($H=8.3$; $P=0.02$; Kruskal–Wallis ANOVA) post occlusion. The highest values of the parameter were observed on days 1 and 3 in group 3 (Fig. 4).

In addition, the groups differed in the frequency distribution of visual fields with the same relative volume. Most visual fields with high values of the relative area of maximum brightness zone were detected on day 1 in group 3 (Fig. 5, Table). In this group, the «porous» areas in the upper molecular layer of SMC were 1.5–2.5 times more frequent ($\chi^2=10.5$; $P=0.01$) (Fig. 1, b).

A comparative analysis of the total numerical density of MBZ in the neuropil of the SMC molecular layer in the controls and post CCA occlusion showed a significant increase in the swollen components of the neuropil (Fig. 6). Multivariate testing of the equality of the medians of this parameter revealed significant differences between the samples of groups 1–3 on days 1 ($H=9.4$; $P=0.01$), 3 ($H=69.6$; $P=0.0001$), and 7 ($H=54.5$; $P=0.0001$; Kruskal–Wallis ANOVA). At the same time, small (but more numerous) MBZs were more frequent in group 2 (unilateral CCA occlusion) (Fig. 7; Table). This suggested more intense neuropil swelling or a tendency for the fusion of MBZs to form conglomerates of irreversibly enlarged/changed astrocyte processes after bilateral 40 min CCA occlusion. Cytoplasmic bio-

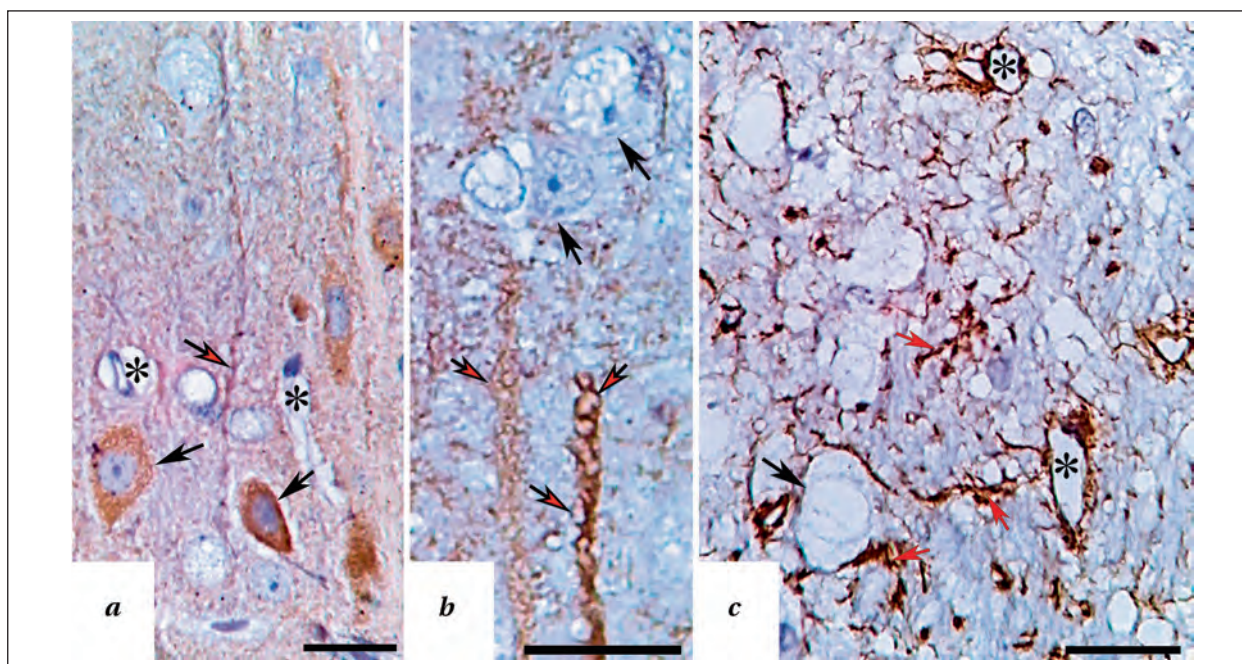


Рис. 3. Иммуногистохимическое типирование нейронов (а), цитоскелета нейронов (b) и астроцитов (с), группа III (3 сут). Fig. 3. Immunohistochemical typing of neurons (a), neuronal cytoskeleton (b) and astrocytes (c), group 3 (day 3).

Note. Pericellular and perivascular edema, vacuolization of dendrites and neuropil. Black arrows indicate perikaryons; red-and-black arrows indicate dendrites; red arrows indicate astrocytic processes; * — capillary lumen. Staining: reaction for NSE (a), MAP-2 (b), and GFAP (c), pre-staining with hematoxylin. $\times 100$ magnification; 20 μm scale.

Примечание. Периделлюлярный и периваскулярный отек, вакуолизация дендритов и нейропиля. Черные стрелки — перикарионы; красно-черные стрелки — дендриты; красные стрелки — отростки астроцитов; * — просветы капилляров. Окраска: реакция на NSE (a), MAP-2 (b) и GFAP (c), докраска гематоксилином. Объектив $\times 100$; шкала — 20 мкм.

Таким образом, найденные гистологические и иммуногистохимические изменения СМК свидетельствовали о разной степени воздействия 20, 30 и 40 мин ООСА на нейроны СМК. Подобные диффузно-мелкоочаговые изменения описаны при поверхностном повреждении СМК другими авторами [25] и ранее нами [14].

Для сравнения степени проявлений отека-набухания СМК в изученных группах использовали анализ цветных изображений одинаковых по размеру (20 \times 20 мкм) участков нейропиля, не содержащих микрососуды, с помощью оценки их пиксельного состава (яркость, количество). Яркие пиксели (выше более темного фона) соответствовали участкам СМК с высоким содержанием воды — ЗМЯ. Установили, что через 1 сут после ООСА во всех группах относительная площадь ЗМЯ (медiana) статистически значимо превышала контрольное значение в 2–2,5 раза. Многомерная проверка равенства медиан данного показателя выявила наличие статистически значимых различий между выборками групп I–III через 1 сут ($H=37,8$; $p=0,0001$), 3 сут ($H=26,6$; $p=0,0001$) и 7 сут ($H=8,3$; $p=0,02$; Kruskal–Wallis ANOVA). При этом наиболее высокие значения показателей отмечали через 1 и 3 сут в группе III (рис. 4).

Кроме того, группы отличались по частотному распределению полей зрения с одинаково-

colloids no longer retained some part of the fluid, which transformed into a free state with probable migration to the intercellular space as well. This created favorable conditions for interstitial edema development [12].

The maximum brightness zones in neuropil (Fig. 8, a, b) detected using the Find Maxima filter had different shapes, sizes and intensity levels. This was clearly seen when using Find Foci plugin (Fig. 8, c). For example, area of one MBZ in this image varied from 0.8 to 14 μm^2 , brightness — from 200 to 252. The largest MBZs in terms of central trend (median) and interquartile range (Q1–Q3) were found in groups 1 and 3 (bilateral CCA occlusion). In group 1, this index was 2.62 (2.43–3.35) on day 1, 2.77 (2.52–3.55) on day 3, and 2.65 (2.12–2.82) on day 7. In group 2 it was 1.98 (1.67–2.51) on day 1, 1.55 (1.43–2.15) on day 3, and 1.56 (1.38–1.90) on day 7. In group III the values were 3.03 (2.87–3.58) on day 1, 2.54 (2.48–3.11) on day 3, and 1.94 (1.76–2.60) on day 7. A multiple comparison (Kruskal–Wallis ANOVA) of the three groups showed significant differences on day 1 ($H=26.8$; $P=0.0001$); day 3 ($H=22.5$; $P=0.0001$); day 7 ($H=8.3$; $P=0.02$).

According to multivariate analysis, the total pixel intensity of maximum brightness in the peaks was significantly different between the groups ($H=30.6$; $P=0.0002$). However, differences were

вым относительным объемом. Больше всего полей зрения с высоким значением относительной площади ЗМЯ выявили через 1 сут в группе III (рис. 5; табл.). В этой группе в 1,5–2,5 раза чаще ($\chi^2=10,5$; $p=0,01$) встречались «пористые» участки в верхнем этаже молекулярного слоя СМК (рис. 1, b).

Сравнительный анализ общей численной плотности ЗМЯ в нейропиле молекулярного слоя СМК в контроле и после ООСА показал наличие статистически значимого увеличения количества набухших компонентов нейропиля (рис. 6). Многомерная проверка равенства медиан данного показателя выявила наличие статистически значимых различий между выборками групп I–III через 1 сут ($N=9,4$; $p=0,01$), 3 сут ($N=69,6$; $p=0,0001$) и 7 сут ($N=54,5$; $p=0,0001$; Kruskal–Wallis ANOVA). При этом мелкие (но более многочисленные) ЗМЯ чаще встречались в группе II (односторонняя ООСА) (рис. 7, табл.). Это свидетельствовало о том, что после двусторонней 40 мин ООСА, вероятно, набухание нейропиля проявлялось сильнее или появлялась тенденция слияния ЗМЯ с образованием конгломератов необратимо расширенных/измененных отростков астроцитов. Биокolloиды цитоплазмы пере-

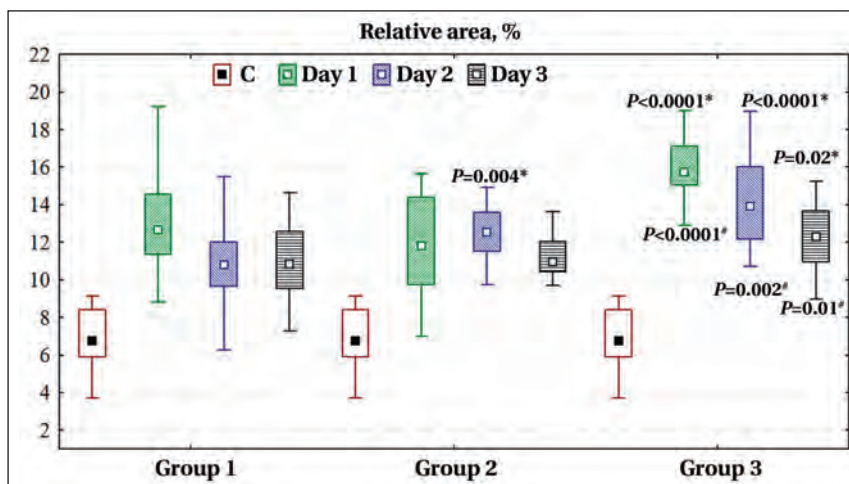


Рис. 4. Относительная площадь зон максимальной яркости в поле зрения нейропиля молекулярного слоя СМК в контроле и после ООСА (1, 3 и 7 сут) в группах I (20 мин), II (30 мин) и III (40 мин).

Fig. 4. Relative area of maximal brightness zones in the visual field of neuropil of the SMC molecular layer in the controls and after CCA occlusion (days 1, 3, and 7) in groups 1 (20 min), 2 (30 min) and 3 (40 min post occlusion).

Note. For fig. 4, 6: c — controls. The differences versus group 1 (*) and group 2 (#) were significant (Mann–Whitney test). Compared to controls, the differences were significant for all groups and time points at $P<0.0001$. Data are presented as median (Me) (Q2), 25–75% quartiles (Q1–Q3), and non-outlier range (Min–Max).

Примечание. Для рис. 4, 6: с — контроль. Различия в сравнении с группой I (*), с группой II (#) статистически значимы (критерий Манна–Уитни). В сравнении с контролем различия значимы для всех групп и сроков при $p<0,0001$. Материал представили как медиану (Me) (Q2), 25–75% квантили (Q1–Q3) и диапазон без выбросов (Min–Max).

found between time points (days 1, 2, and 3) only in group 3 ($H=11.5$; $P=0.003$), and between groups on the same time points on day 1 ($H=12.2$; $P=0.002$) and day 3 ($H=10.8$; $P=0.01$). On day 7 post CCA occlusion, this parameter was approximately identical in all groups (Fig. 9). Probably, during this period, a decrease in the intracellular water content occurred accompanied by resolution of the structural features of cytotoxic neuropil edema. This was

Многомерное сравнение частотного распределения полей зрения по относительной площади и количеству зон максимальной яркости в молекулярном слое СМК (корреспондентский анализ).

Multivariate comparison of the frequency distribution of visual fields by relative area and number of zones of maximum brightness in the molecular layer of the SMC (correspondence analysis).

Comparison	Result	
	Area	Number
Group 1 vs group 2	$\chi^2=84.0$; $df=45$; $P=0.0004^*$	$\chi^2=211.6$; $df=70$; $P=0.000^*$
Group 1 vs group 3	$\chi^2=150.0$; $df=65$; $P<0.0001^*$	$\chi^2=150.2$; $df=60$; $P=0.000^*$
Group 2 vs group 3	$\chi^2=167.0$; $df=60$; $P<0.0001^*$	$\chi^2=143.5$; $df=55$; $P=0.000^*$
Intragroup 1 between various time points	$\chi^2=29.0$; $df=18$; $P=0.047$	$\chi^2=28.4$; $df=18$; $P=0.06$
Intragroup 2 between various time points	$\chi^2=39.0$; $df=16$; $P=0.001^*$	$\chi^2=51.8$; $df=22$; $P=0.0003^*$
Intragroup 3 between various time points	$\chi^2=49.0$; $df=22$; $P=0.001^*$	$\chi^2=35.4$; $df=16$; $P=0.01^*$
Intergroup on day 1	$\chi^2=60.0$; $df=24$; $P=0.0001^*$	$\chi^2=21.4$; $df=18$; $P=0.26$
Intergroup on day 3	$\chi^2=42.0$; $df=11$; $P<0.0001^*$	$\chi^2=113.5$; $df=26$; $P=0.000^*$
Intergroup on day 7	$\chi^2=42.0$; $df=11$; $P<0.0001^*$	$\chi^2=76.0$; $df=26$; $P=0.000^*$
Between the controls and each time point groupwise	$\chi^2>40$; $df=11$; $P<0.0001^*$	$\chi^2>40$; $df=10$; $P<0.0001^*$

Примечание. Comparison — сравнение; result — результат; area — площадь; number — количество; group 1 vs group 2 — группа 1 по сравнению с группой 2; intragroup ... between various time points — внутри группы ... между сроками; intergroup on day ... — между группами через ... сут; between the controls and each time point groupwise — между контролем и каждым сроком по группам; the differences were considered significant at ... — различия статистически значимы при...

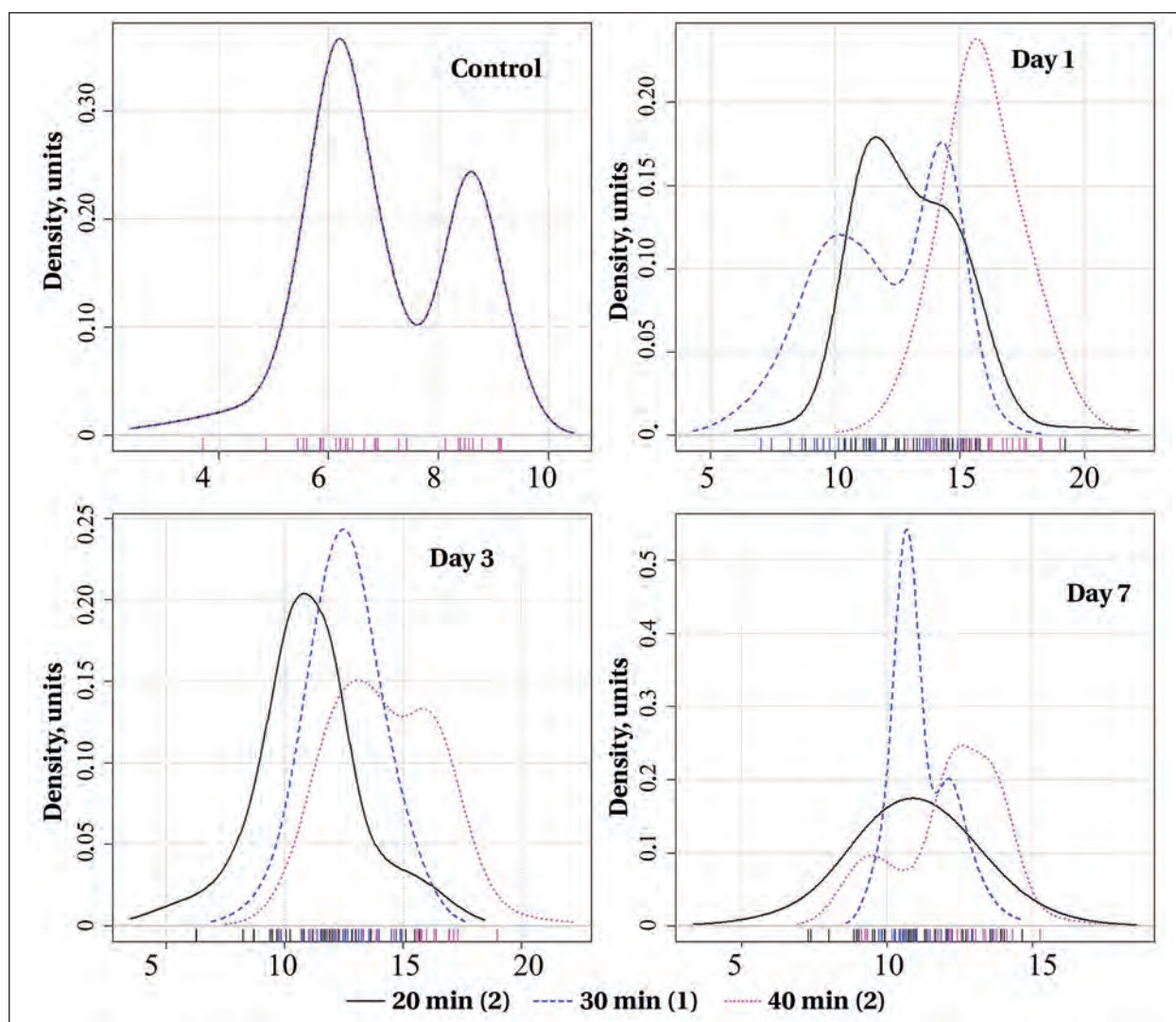


Рис. 5. Частотное распределение полей зрения по относительному объему (площади) зон максимальной яркости в молекулярном слое СМК в контроле и после ООСА (1, 3 и 7 сут) в группах I (20 мин), II (30 мин) и III (40 мин).
Fig. 5. Frequency distribution of visual fields by relative volume (area) of maximum brightness zones in the molecular layer of SMC in the controls and after CCA occlusion (days 1, 3, and 7) in groups I (20 min), 2 (30 min), and 3 (40 min post occlusion).
Note. For fig. 5, 7: X-axis: the relative area of zones with the maximum brightness (ZMB). Common carotid artery occlusion (CBA): (1) — unilateral CBA and (2) — bilateral CBA.

Примечание. Для рис. 5, 7: Density, units — плотность, ед. По оси X — относительная площадь зон максимальной яркости (ЗМЯ). (1) — односторонняя и (2) — двусторонняя окклюзия общих сонных артерий (ООСА).

ставали удерживать часть жидкости, и она трансформировалась в свободное состояние, вероятно, переходила и в межклеточное пространство. Возникали условия для формирования интерстициального отека [12].

Выявленные с помощью фильтра Find Maxima ЗМЯ в нейропиле СМК (рис. 8, *a, b*) имели разные формы, размеры и степень яркости. Это отчетливо проявлялось при использовании возможностей плагина Find Foci (рис. 8, *c*). Например, площадь одной ЗМЯ на этом рисунке варьировалась от 0,8 до 14 мкм², яркость — от 200 до 252. Наиболее крупные ЗМЯ по показателю центральной тенденции (медиана) и интерквартильного размах (Q1–Q3) выявлены в группе I и III (дву-

most evident after 40 min of CCA occlusion (Figs. 8, 9). This group had the highest values of the total pixel intensity of the maximal brightest and largest in area peaks of the visual field of the neuropil molecular layer of SMC, which were detected 3 days post ischemia. The maximum amount of bound/free fluid detected by brightness foci was noted in edema of the neuropil of the upper SMC molecular layer and perivascular spaces (Fig. 1, *b, c, d*; Fig. 9). These zones corresponded to the accumulation of GFAP-positive material in the controls seen in the upper level (superficial glial limiting membrane formed by specialized astrocyte processes) and around the vessels (Fig. 1, *c, f*).

The total pixel intensities of the peaks determined using the Find Foci plugin ranged from

сторонняя ООСА). В группе I через 1 сут этот показатель составил 2,62 (2,43–3,35), 3 сут — 2,77 (2,52–3,55), 7 сут — 2,65 (2,12–2,82). В группе II через 1 сут — 1,98 (1,67–2,51), 3 сут — 1,55 (1,43–2,15), 7 сут — 1,56 (1,38–1,90). В группе III через 1 сут — 3,03 (2,87–3,58), 3 сут — 2,54 (2,48–3,11), 7 сут — 1,94 (1,76–2,60). Множественное сравнение (Kruskal–Wallis ANOVA) трех групп показало наличие статистически значимых различий: через 1 сут (H=26,8; $p=0,0001$); через 3 сут (H=22,5; $p=0,0001$); через 7 сут (H=8,3; $p=0,02$).

По данным многомерного анализа, общая интенсивность пикселей максимальной яркости в пиках статистически значимо отличалась между группами (H=30,6; $p=0,0002$). Однако, между сроками (1, 2, и 3 сут) различия были выявлены только в группе III (H=11,5; $p=0,003$), а между группами по одинаковым срокам — через 1 сут (H=12,2; $p=0,002$) и 3 сут (H=10,8; $p=0,01$). Через 7 сут после ООСА этот показатель был примерно на одном уровне во всех группах (рис. 9). Вероятно, в этот период происходило уменьшение содержания внутриклеточной воды, сопровождающееся инволюцией структурных проявлений цитотоксического отека-набухания нейропиля. Наиболее наглядно это проявлялось после 40 мин ООСА (рис. 8, 9). Для этой группы были характерны самые большие значения общей интенсивности пикселей максимально ярких и крупных по площади пиков поля зрения нейропиля молекулярного слоя СМК, которые выявлялись через 3 сут после ишемии. Максимальное количество связанной/свободной воды, выявленной по фокусам яркости, при развитии эдематозных изменений отметили в нейропиле верхнего этажа молекулярного слоя СМК и периваскулярных пространствах (рис. 1, b, c, d; рис. 9). Эти зоны соответствовали скоплению GFAP-позитивного материала в контроле — верхний этаж (поверхностная глиальная пограничная мембрана, образованная отростками специализированных астроцитов) и вокруг сосудов (рис. 1, c, f).

Общая интенсивность пикселей пиков, выявленная при использовании плагина Find Foci, варьировала от 70000 до 2280000. Однако

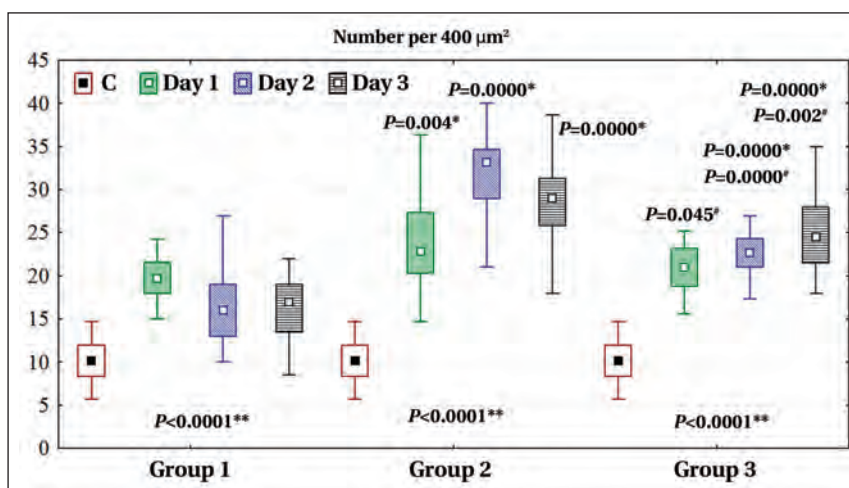


Рис. 6. Общая численная плотность зон максимальной яркости в нейропиле молекулярного слоя СМК в контроле и после ООСА (1, 3 и 7 сут) в группах I (20 мин), II (30 мин) и III (40 мин).

Fig. 6. Total numerical density of maximal brightness zones in the neuropil of SMC molecular layer in the controls and after CCA occlusion (days 1, 3 and 7) in groups 1 (20 min), 2 (30 min) and 3 (40 min post occlusion).

Note. The differences versus group 1 (*) and group 2 (#) are significant (Mann–Whitney test). Compared to controls, differences were significant for all groups and time points at $P<0.0001$. Data are presented as median (Me) (Q2), 25–75% quartiles (Q1–Q3), and non-outlier range (Min–Max).

Примечание. Number per 400 μm^2 — количество на 400 μm^2 . Различия в сравнении с группой I (*), с группой II (#) статистически значимы (критерий Манна–Уитни). В сравнении с контролем различия значимы для всех групп и сроков при $p<0,0001$. Материал представлен как медиана (Me) (Q2), 25–75% квантили (Q1–Q3) и диапазон без выбросов (Min–Max).

70,000 to 2,280,000. However, for the majority of the detected peaks, the total pixel intensity did not exceed 200,000. Larger peaks were 20.3% (95% CI: 6.7–32.6%; $\chi^2=8.6$; $P=0.003$) more frequent in animals after bilateral CCA occlusion (groups 1 and 3) (Fig. 10).

The results of our study indicate that after 20, 30, and 40 min of OOSA, signs of edema with cell swelling appeared in the SMC. Prevalent features included swelling and vacuolization of dendrites, swelling of astrocytes of the upper molecular layer neuropil where the distal dendrites of the underlying layers of pyramidal neurons were located. These changes were mostly reversible, but associated with destruction of some neurons. The study of morphometric evolution of edema in the SMC showed that edema with cell swelling persisted in varying degrees in all groups during the entire observation period (7 days) after CCA occlusion. The most severe edema with cell swelling occurred after 40 min CCA occlusion. This type of occlusion was also characterized by a more significant reduction in the total numerical density of pyramidal neurons.

The ischemic area looks more pale under mild exposure due to vacuolization of the neuropil, which consists of neuronal processes and glia. The lesion site is localized in the superficial layers of the

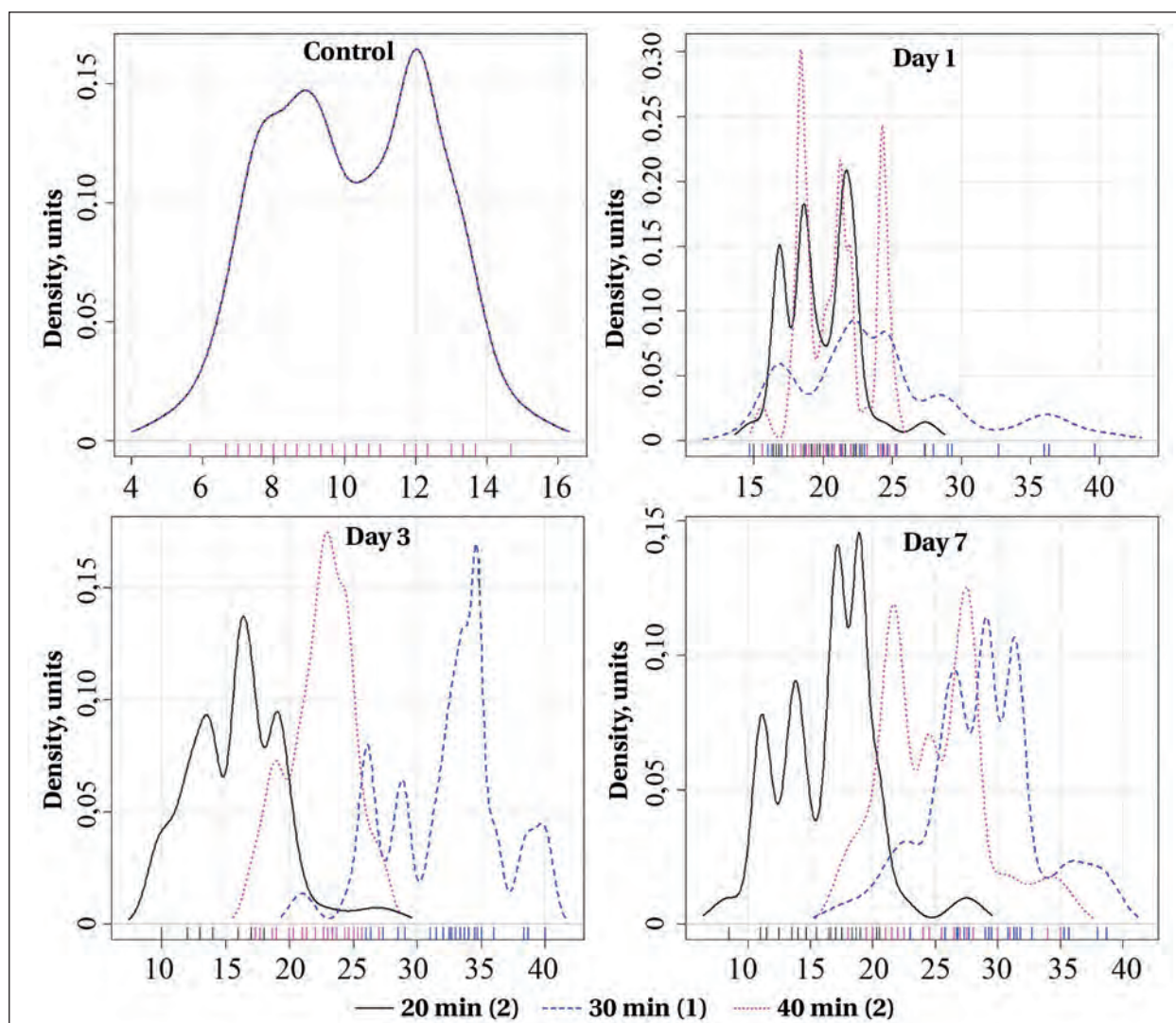


Рис. 7. Частотное распределение полей зрения по количеству зон максимальной яркости в молекулярном слое (МС) сенсомоторной коры в контроле и после ООСА (1, 3 и 7 сут) в группах I (20 мин), II (30 мин) и III (40 мин).

Fig. 7. Frequency distribution of visual fields by number of maximum brightness zones in the molecular layer of SMC in the controls and after CCA occlusion (days 1, 3, and 7) in groups 1 (20 min), 2 (30 min), and 3 (40 min post occlusion).

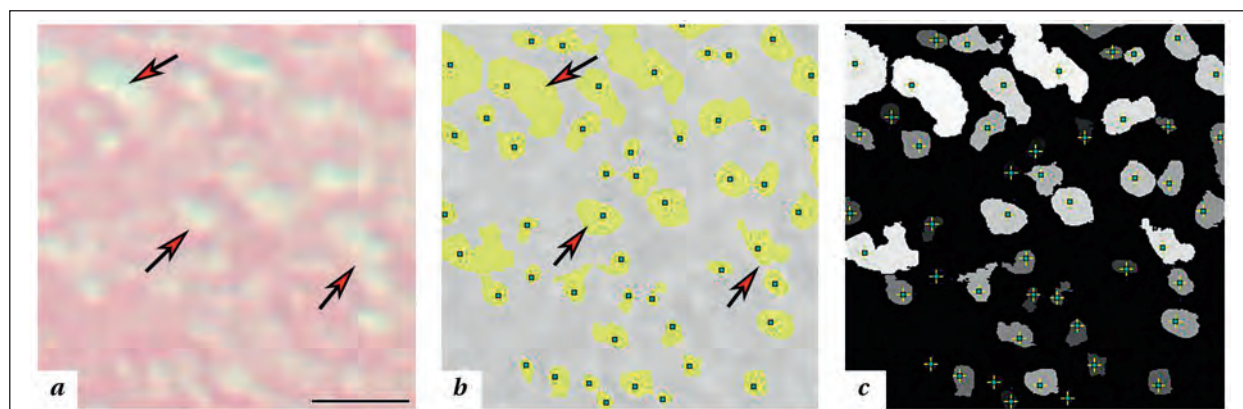


Рис. 8. Участок нейропила верхнего этажа молекулярного слоя СМК через 7 сут после 40 мин ООСА.

Fig. 8. A region of the neuropil of the upper SMC molecular layer 7 days post 40 min CCA occlusion.

Note. Edema with clearing (*a, b*; arrows) in the neuropil, with varying brightness (*c*; marked by + and \blacksquare), shape and size (*b, c*). Hematoxylin-eosin staining (*a*), plot transformation using the Find Maxima filter (*b*) and Find Foci plugin (*c*). A 6 μ m scale.

Примечание. Эдематозные изменения с появлением на фоне нейропила светлых зон (*a, b*; стрелки), отличающихся яркостью (*c*; отмечено + и \blacksquare), формой и размерами (*b, c*). Окраска гематоксилин-эозином (*a*), трансформация графики с помощью фильтра Find Maxima (*b*) и плагина Find Foci (*c*). Шкала — 6 мкм.

для основной массы выявленных пиков общая интенсивность пикселей не превышала 200000. Более крупные пики чаще встречались у животных после двусторонней ООСА (группы I и III) — на 20,3% (95% ДИ: 6,7–32,6%; $\chi^2=8,6$; $p=0,003$) (рис. 10).

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что после 20, 30 и 40 мин ООСА в СМК появлялись признаки отека-набухания. Преобладали проявления набухания и вакуолизации дендритов, набухания астроцитов нейропиля верхнего этажа молекулярного слоя, в котором локализовались дистальные дендриты нижележащих слоев пирамидных нейронов. Данные изменения имели в основном обратимый характер, но сопровождалась деструкцией части нейронов. Исследования динамики морфометрических характеристик проявлений эдематозных изменений в СМК показало, что после ООСА во всех группах отек-набухание в той или иной степени сохранялся в течение всего периода наблюдения (7 сут). Наиболее выраженными проявлениями отека-набухания были после 40 мин ООСА. Для данного варианта окклюзии была характерна и более значительная редукция общей численной плотности пирамидных нейронов.

Известно, что при слабом воздействии ишемическая область выглядит бледнее вследствие вакуолизации нейропиля, состоящего из отростков нейронов и глии. Участок повреждения локализуется в поверхностных слоях коры. В основном проявляются структурные перестройки дендритов поверхностных слоев коры. В некоторых случаях на фоне таких набухших дендритов выявляется цитотоксический отек глиальных клеток и перичеллюлярный отек сомы отдельных нервных клеток, редко встречаются тела гиперхромных нейронов. Основная масса тел нейронов поверхностных слоев остается неповрежденной, в нижележащих слоях все нейроны остаются интактными [25].

Сопоставляя эти данные с нашими, можно сделать заключение о том, что после 20, 30 и, особенно, 40 мин ООСА развивались умерен-

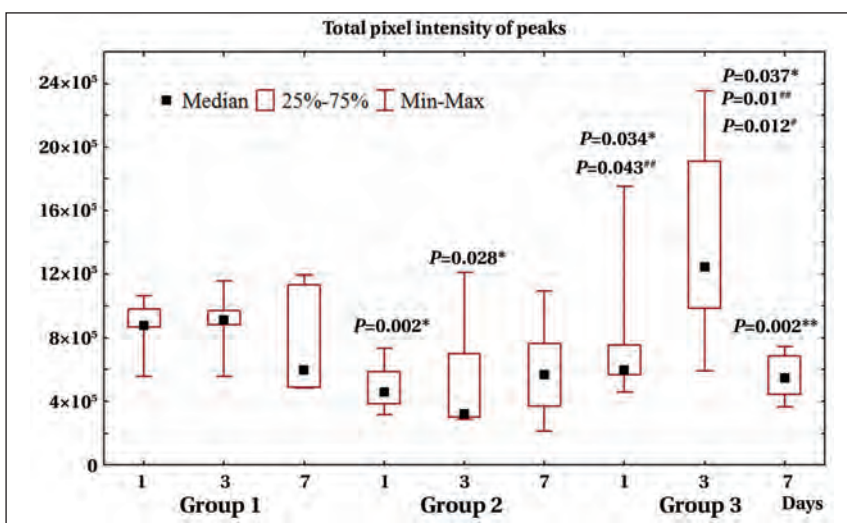


Рис. 9. Общая интенсивность пикселей максимально ярких и крупных по площади пиков поля зрения нейропиля молекулярного слоя СМК в контроле и после ООСА (1, 3 и 7 сут) в группах I (20 мин), II (30 мин) и III (40 мин).

Fig. 9. Total pixel intensity of the maximal brightest and largest by area peaks of the visual field of neuropil molecular layer of SMC in controls and after CCA occlusion (days 1, 3 and 7) in groups 1 (20 min), 2 (30 min) and 3 (40 min post occlusion).

Note. Differences versus groups 1 (*) and 2 (**), vs day 1 (#) and day 3 (**) were significant (Mann-Whitney test). Data are presented as median (Me) (Q2), 25–75% quartiles (Q1–Q3), and non-outlier range (Min–Max).

Примечание. Total pixel intensity of peaks — общая интенсивность пикселей в пике. Различия в сравнении с группой I (*), с группой II (**), с 1 сут (#), с 3 сут (**) статистически значимы (критерий Манна-Уитни). Материал представлен как медиана (Me) (Q2), 25–75% квантили (Q1–Q3) и диапазон без выбросов (Min–Max).

cortex. Structural rearrangements of dendrites of superficial cortical layers are the most apparent features. Occasionally, cytotoxic edema of glial cells and pericellular edema of soma of individual nerve cells can be revealed amid such swollen dendrites; hyperchromic neuronal bodies can be rarely found. The majority of neuronal bodies in the superficial layers and all neurons in the underlying layers remain intact [25].

Comparing these data with our own, we can conclude that after 20, 30, and, especially, 40 min CCA occlusion, mostly moderate structural and functional changes developed, whereas in some ischemic areas of the SMC even severe ones could be observed.

According to the literature, astrocytes are obviously damaged by ischemia, and their dysfunction can lead to neuronal death or dysfunction. Heterogeneous degeneration of astrocytic processes around neurons of varying viability causes further neuronal injury and death due to secondary reduction of energy supply to necrotic neurons and disruption of glutamate-glutamine cycle and ionic homeostasis [12]. We assume the linear relationship between these changes and the duration of ischemia based on our findings: the mildest morphometric evidence of edema with cell swelling was obtained after 30 min unilateral CCA occlusion, while the most severe one was seen after 40-min bilateral CCA occlusion.

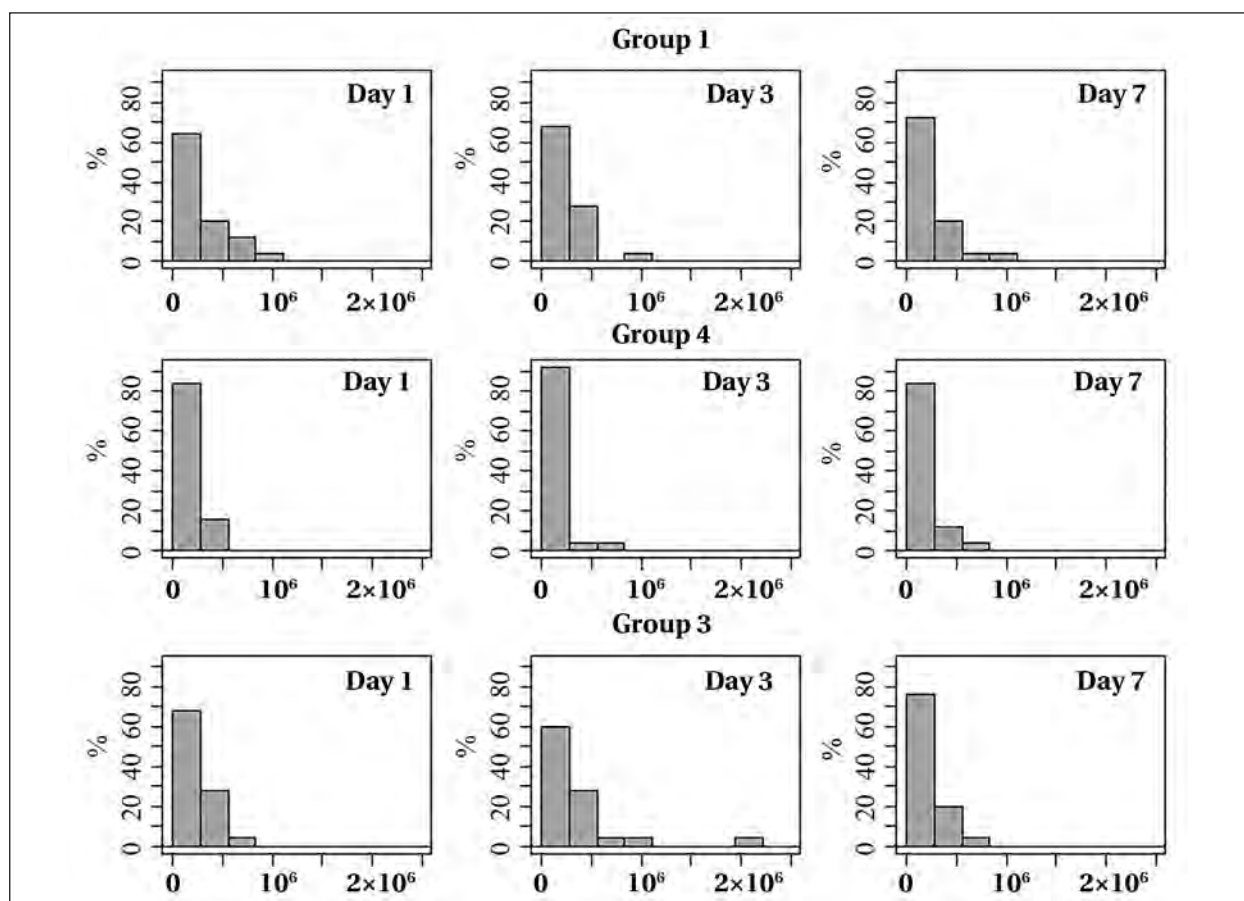


Рис. 10. Гистограмма распределения пиков с разной общей интенсивностью пикселей изображения поля зрения нейропила молекулярного слоя СМК в контроле и после ООСА (1, 3 и 7 сут) в группах I (20 мин), II (30 мин) и III (40 мин). Fig. 10. Histogram of the distribution of peaks with different total pixel intensities of the visual field image of the SMC molecular layer neuropil in the controls and after CCA occlusion (days 1, 3, and 7) in groups 1 (20 min), 2 (30 min), and 3 (40 min post occlusion).

ные структурно-функциональные изменения, а в отдельных ишемизированных зонах СМК — даже сильные.

По данным литературы, очевидно, что астроциты повреждаются ишемией, а их дисфункция может привести к гибели или дисфункции нейронов. Гетерогенная дегенерация астроцитарных отростков вокруг нейронов разной степени жизнеспособности вызывает дальнейшие повреждения и гибель нейронов из-за вторичного снижения энергоснабжения некробиотических нейронов и нарушения глутамат-глутаминового цикла и ионного гомеостаза [12]. Мы предполагаем, что существует линейная зависимость подобных изменений от продолжительности ишемии — наименьшие морфометрические проявления отека-набухания нами получены при 30 мин односторонней, а наибольшие — при 40 мин двусторонней ООСА.

Установили, что после ООСА появлялись «пористые» изменения нейропила СМК, в зоне расположения которых резко уменьшалось содержание GFAP-позитивного материала. В более отдаленном периоде, вероятно, в результате активации механизмов реактивного аст-

We found that after CCA occlusion «porous» changes appeared in the neuropil of SMC associated with a local dramatic reduction in the GFAP-positive material. Later on, probably as a result of reactive astrocytosis mechanisms, there was a partial recovery and even hypertrophy of the astrocytic processes in this area [26].

Swelling of the distal dendrites in the upper layers of the cortex is one of the characteristic morphological alterations in mild ischemic exposure. Neurodegeneration is known to start specifically from distal dendrites. On the other hand, deactivation of the superficial cortical layers disrupts the projections of the thalamic cells into the upper cortical layers, thus resulting in delta activity [25].

One may suppose that edema with cell swelling and varicose dilation of the distal dendrites of the molecular layer of the cortex after acute ischemia leads to increased inhibition in the cortex, manifested by delta activity. The intensification of inhibitory processes is apparently due to attenuated influences arriving to the cortex from nonspecific subcortical systems. This can be considered as one of the mechanisms of natural protection of neurons after ischemia [25].

роцитоза, происходило частичное восстановление и даже гипертрофия отростков астроцитов этой зоны [26].

При слабом ишемическом воздействии одной из характерных морфологических перестроек является набухание дистальных отделов дендритов в верхних слоях коры. Известно, что именно с дистальных дендритов начинается нейродегенерация. С другой стороны, выключение поверхностных слоев коры нарушает проекции клеток таламуса в верхние слои коры, благодаря этому появляется дельта-активность [25].

Можно полагать, что отек-набухание и варикозное расширение дистальных дендритов молекулярного слоя коры после острой ишемии приводит к усилению торможения в коре, что выражается в дельта-активности. Усиление тормозных процессов происходит, по-видимому, за счет ослабления активирующих влияний, приходящих в кору от неспецифических подкорковых систем. Это можно рассматривать как один из механизмов естественной защиты нейронов после ишемии [25].

По литературным данным, гидропические изменения в нейропиле молекулярного слоя после острой ишемии сопровождаются редукцией значительной части межнейронных синапсов по светлому типу деструкции, что также свидетельствует о нарушениях коммуникации нейронов неокортекса и неспецифических ядер таламуса [27]. «Жертвуют» дендритами и синапсами в остром постишемическом периоде, нейроны, вероятно, спасают себя от гиперактивации и необратимого эксайтотоксического повреждения, а система коммуникации восстанавливается уже через 3–7 сут реперфузии в результате активации механизмов нейропластичности.

Заключение

В сенсомоторной коре головного мозга белых крыс после перенесенной 20, 30 и 40 мин ООСА появлялись признаки цитотоксического отека-набухания, развивались очаговые деструктивные и адаптивные изменения нейронов и астроглии. Проявления отека-набухания сохранялись на протяжении всего периода наблюдения (7 сут).

Через 1 и 3 сут после ООСА часть отростков астроцитов СМК разрушалась, а у других появлялись признаки адаптивных и компенсаторных реактивных изменений. В большей степени страдали структуры верхнего этажа молекулярного слоя — в субпиальной зоне под наружной пограничной глиальной мембраной мозга.

После односторонней 30 мин ООСА развивались слабые и умеренные, а после двусто-

According to the literature data, hydroptic changes in the molecular layer neuropil after acute ischemia are accompanied by reduction of a significant part of interneuronal synapses via «clear» destruction mechanism, which also indicates disturbances in communication between neocortex neurons and nonspecific thalamic nuclei [27]. By «sacrificing» dendrites and synapses in the acute postischemic period, neurons probably protect themselves from hyperactivation and irreversible excitotoxic damage, and the communication system is restored after 3–7 days of reperfusion as a result of neuroplasticity mechanisms activation.

Conclusion

In the sensorimotor cerebral cortex of white rats post 20, 30, and 40 min CCA occlusion, signs of cytotoxic edema were observed, and focal destructive and adaptive changes in neurons and astroglia developed. Edema persisted throughout the entire observation period (7 days).

On days 1 and 3 after CCA occlusion, some of the SMC astrocyte processes were destructed, while others showed adaptive and compensatory reactive changes. The structures of the upper level of the molecular layer, located in the subpial zone under the external glial limiting membrane of the brain, suffered to a greater extent.

Mild and moderate (after unilateral 30 min CCA occlusion) to moderate and severe (after bilateral 40 min CCA occlusion) focal structural and functional changes of the SMC with large zones of neuropil clearing, severe perivascular and perineuronal edema of the astrocytic processes developed.

Thus, new quantitative data were obtained on the patterns of neocortical edema with cell swelling development after 20, 30 and 40 min CCA occlusion. These data might help understand the structural basis for the transition of reactive/protective changes into pathological ones due to the reorganization of neuroglial interrelations. The 40 min CCA occlusion could serve as a sort of borderline ischemia period which induces this transition. Specifically after this period the most severe manifestations of post-ischemic cytotoxic edema such as failure of homeostatic and adaptive mechanisms, dysfunction of astrocytes, large number of shranked neurons and their death were revealed.

Authors' contribution. The authors personally and equally participated in the implementation of a comprehensive methodological approach, including experimental, anatomical, histological, morphometric and computational methods, as well as observation, description and analysis of the obtained data.

ронней 40 мин ООСА — умеренные и даже сильные мелкоочаговые структурно-функциональные изменения СМК с появлением боль-

ших зон просветления нейропиля, выраженно-го периваскулярного и перинейронального отека отростков астроцитов.

Таким образом, получены новые количественные данные об особенностях развития отека-набухания неокортекса после 20, 30 и 40 мин ООСА. Эти данные могут быть использованы для понимания структурных основ перехода реактивных/защитных изменений в патологические за счет реорганизации нейроглиальных взаимоотношений. Своеобразным пограничным сроком продолжительности ишемии, вероятно, является 40 мин ООСА.

Именно после нее выявили наибольшие проявления постишемического цитотоксического отека-набухания — срыв гомеостатических и адаптационных механизмов, дисфункцию астроцитов, образование большого количества и гибель пикноморфных нейронов.

Участие авторов. Авторы лично и в равном количестве принимали участие в реализации комплексного методологического подхода, включающего экспериментальный, анатомический, гистологический, морфометрический и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа.

Литература

1. Баширова А.Р., Сундуков Д.В., Бабкина А.С., Голубев М.А., Телипов И.Н. Морфометрические изменения клеток коры головного мозга при острых отравлениях клозапином в сочетании с этиловым спиртом. *Общая реаниматология*. 2020; 16 (6): 19–30. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-6-19-30
2. Bailey D.M., Bärtsch P., Knauth M., Baumgartner R.W. Emerging concepts in acute mountain sickness and high-altitude cerebral edema: from the molecular to the morphological. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66 (22): 3583–3594. DOI: 10.1007/s00018-009-0145-9.
3. Adeva M.M., Souto G., Donapetry C., Portals M., Rodriguez A., Lamas D. Brain edema in diseases of different etiology. *Neurochem Int*. 2012; 61 (2): 166–174. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.05.007
4. Wang Y.F., Pappas V. Astroglial modulation of hydromineral balance and cerebral edema. *Front Mol Neurosci*. 2018; 11: 204. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00204.
5. Slivka A., Murphy E., Horrocks L. Cerebral edema after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*. 1995; 26 (6): 1061–1065. DOI: 10.1161/01.str.26.6.1061.
6. Keep R.F., Jones H.C., Drewes L.R. This was the year that was: brain barriers and brain fluid research in 2019. *Fluids Barriers CNS*. 2020; 17 (1): 20. DOI: 10.1186/s12987-020-00181-9.
7. Krueger M., Mages B., Hobusch C., Michalski D. Endothelial edema precedes blood-brain barrier breakdown in early time points after experimental focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathologica Communications*. 2019; 7: 17. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0671-0>
8. Ding Y., Liu J., Xu Y., Dong X., Shao B. Evolutionary adaptation of Aquaporin-4 in Yak (*Bos grunniens*) brain to high-altitude hypoxia of Qinghai-tibetan plateau. *High altitude medicine & biology*. 2020; 21 (2). DOI: 10.1089/ham.2019.0076
9. Hinzman J.M., DiNapoli V.A., Mahoney E.J., Gerhardt G.A., Hartings J.A. Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions. *Exp Neurol*. 2015; 267: 243–253. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.03.014.
10. Dreier J.P., Lemale C.L., Kola V., Friedman A., Schoknecht K. Spreading depolarization is not an epiphenomenon but the principal mechanism of the cytotoxic edema in various gray matter structures of the brain during stroke. *Neuropharmacol*. 2018; 15 (134): 189–207. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.027.
11. Квитницкий-Рыжов Ю.Н. Отек и набухание головного мозга. Киев: «Здоров'я»; 1978: 184.
12. Ito U., Hakamata Y., Kawakami E., Oyanagi K. Degeneration of astrocytic processes and their mitochondria in cerebral cortical regions peripheral to the cortical infarction: heterogeneity of their disintegration is closely associated with disseminated selective neuronal necrosis and maturation of injury. *Stroke*. 2009; 40 (6): 2173–2181. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.534990.
13. Моргунов А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Кувачева Н.В., Панина Ю.А., Таранушенко Т.Е., Солончук Р.Ю., Салмина А.Б. Структурная и функциональная гетерогенность астроцитов головного мозга: роль в нейродегенерации и нейровоспалении. *Бюлл. сибирской медицины*. 2014; 13 (5): 138–148. DOI: 10.20538/1682-0363-2014-5-138-148
14. Степанов А.С., Акулинин В.А., Мызык А.В., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии. *Общая реаниматология*. 2017; 13 (6): 6–17. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-6-17
15. Pekny M., Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014; 94: 1077–1098. DOI: 10.1152/physrev.00041.2013.
16. Bai J., Lyden P.D. Переосмысленная постишемическая реперфузионная повреждение головного мозга: новые взгляды на понимание механизмов нарушения реперфузии, кровоизлияния и отека. *International J. Stroke*. 2015; 10 (2): 143–152. DOI: 10.1111/ijvs.12434

References

1. Bashirova A.R., Sundukov D.V., Babkina A.S., Golubev M.A., Telipov I.N. Morphometry of cortical neurons in acute clozapine and ethanol poisoning. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology*. 2020; 16 (6): 19–30 [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-6-19-30
2. Bailey D.M., Bärtsch P., Knauth M., Baumgartner R.W. Emerging concepts in acute mountain sickness and high-altitude cerebral edema: from the molecular to the morphological. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66 (22): 3583–3594. DOI: 10.1007/s00018-009-0145-9.
3. Adeva M.M., Souto G., Donapetry C., Portals M., Rodriguez A., Lamas D. Brain edema in diseases of different etiology. *Neurochem Int*. 2012; 61 (2): 166–174. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.05.007
4. Wang Y.F., Pappas V. Astroglial modulation of hydromineral balance and cerebral edema. *Front Mol Neurosci*. 2018; 11: 204. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00204.
5. Slivka A., Murphy E., Horrocks L. Cerebral edema after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*. 1995; 26 (6): 1061–1065. DOI: 10.1161/01.str.26.6.1061.
6. Keep R.F., Jones H.C., Drewes L.R. This was the year that was: brain barriers and brain fluid research in 2019. *Fluids Barriers CNS*. 2020; 17 (1): 20. DOI: 10.1186/s12987-020-00181-9.
7. Krueger M., Mages B., Hobusch C., Michalski D. Endothelial edema precedes blood-brain barrier breakdown in early time points after experimental focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathologica Communications*. 2019; 7: 17. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0671-0>
8. Ding Y., Liu J., Xu Y., Dong X., Shao B. Evolutionary adaptation of Aquaporin-4 in Yak (*Bos grunniens*) brain to high-altitude hypoxia of Qinghai-tibetan plateau. *High altitude medicine & biology*. 2020; 21 (2). DOI: 10.1089/ham.2019.0076
9. Hinzman J.M., DiNapoli V.A., Mahoney E.J., Gerhardt G.A., Hartings J.A. Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions. *Exp Neurol*. 2015; 267: 243–253. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.03.014.
10. Dreier J.P., Lemale C.L., Kola V., Friedman A., Schoknecht K. Spreading depolarization is not an epiphenomenon but the principal mechanism of the cytotoxic edema in various gray matter structures of the brain during stroke. *Neuropharmacol*. 2018; 15 (134): 189–207. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.027.
11. Kvitnitskiy-Ryzhov Yu.N. Swelling and swelling of the brain. Kiev: «Zdorov'ya»; 1978: 184 [In Russ.].
12. Ito U., Hakamata Y., Kawakami E., Oyanagi K. Degeneration of astrocytic processes and their mitochondria in cerebral cortical regions peripheral to the cortical infarction: heterogeneity of their disintegration is closely associated with disseminated selective neuronal necrosis and maturation of injury. *Stroke*. 2009; 40 (6): 2173–2181. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.534990.
13. Morgun A.V., Malinovskaya N.A., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Kuvacheva N.V., Panina Yu.A., Taranushenko T.E., Solonchuk R.Yu., Salmina A.B. Structural and functional heterogeneity of astrocytes in the brain: role in neurodegeneration and neuroinflammation. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2014; 13 (5): 138–148 [In Russ.]. DOI: 10.20538/1682-0363-2014-5-138-148
14. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Mysik A.V., Stepanov S.S., Avdeev D.B. Neuro-Glio-Vascular Complexes of the Brain After Acute Ischemia. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology*. 2017; 13 (6): 6–17. [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-6-17
15. Pekny M., Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014; 94: 1077–1098. DOI: 10.1152/physrev.00041.2013
16. Bai J., Lyden P.D. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. *International J. Stroke*. 2015; 10 (2): 143–152. DOI: 10.1111/ijvs.12434

17. Von Kummer R., Dzialowski I. Imaging of cerebral ischemic edema and neuronal death. *Neuroradiology*. 2017; 59 (6): 545–553. DOI: 10.1007/s00234-017-1847-6.
18. Бабкина А.С., Баева А.А., Баширова А.Р., Благодравов М.Л., Голубев А.М., Гребенчиков О.А., Гречко А.В., Ершов А.В., Захарченко В.Е., Кузовлев А.Н., Муслимов Б.Г., Острова И.В., Перепелица С.А., Петрова М.В., Романова О.Л., Саидов Ш.Х., Силачев Д.Н., Сундукков Д.В., Телипов И.Н., Усманов Э.Ш., Хаджиева М.Б., Чурилов А.А., Шабанов А.К., Шевелев О.А. Биологические маркеры повреждения и регенерации центральной нервной системы. Москва: ООО «ВЦИ»; 2021: 432. ISBN 9785604415900.
19. Shi K., Tian De-Cai, Li Zhi-Guo, Ducruet A.F., Lawton M.T., Shi Fu-Dong. Global brain inflammation in stroke. *Lancet Neurol*. 2019; 18 (11): 1058–1066. DOI: 10.1016/S1474-4422 (19)30078-X.
20. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
21. Herbert A.D., Carr A.M., Hoffmann E. FindFoci: a focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis. *PLoS One*. 2014; 9 (12): e114749. DOI: 10.1371/journal.pone.0114749
22. Bolon B., Garman R., Jensen K., Krinke G., Stuart B. Best practices approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing. *Toxicol. Pathol.* 2006; 34 (3): 296–313. DOI: 10.1080/01926230600713269
23. Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S., Otani N., Osumi A., Toyooka T., Shima K. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol.* 2006; 112 (4): 471–481. DOI: 10.1007/s00401-006-0108-2
24. Боровиков В. Статистика. Искусство анализа данных на компьютере. Изд-во Питер; 2003: 2-ое изд.: 688.
25. Волкова Д.А., Косицын Н.С., Голобородько Е.В., Логинова Н.А., Свинов М.М. Электрофизиологические корреляты морфологических перестроек при моделировании локальной ишемии разной степени тяжести в сенсомоторной коре крыс. *Бюлл. Эксперим. Биол. Медиц.* 2013; 155 (2): 233–236. DOI: 10.1007 / s10517-013-2128-y
26. 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. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2019; 105 (5): 578–590. DOI: 10.1134/S086981391905011X
27. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). М.: Директ-Медиа; 2014.
17. Von Kummer R., Dzialowski I. Imaging of cerebral ischemic edema and neuronal death. *Neuroradiology*. 2017; 59 (6): 545–553. DOI: 10.1007/s00234-017-1847-6.
18. Babkina A.S., Baeva A.A., Bashirova A.R., Blagodaravov M.L., Golubev A.M., Grebenchikov O.A., Grechko A.V., Ershov A.V., Zakharchenko V.E., Kuzovlev A.N., Muslimov B.G., Ostrova I.V., Perepelitsa S.A., Petrova M.V., Romanova O.L., Saidov Sh.Kh., Silachev D.N., Sundukov D.V., Teliyov I.N., Usmanov E.Sh., Khadzhieva M.B., Churilov A.A., Shabanov A.K., Shevelev O.A. Biological markers of damage and regeneration of the central nervous system. Moscow: ООО «VTsi»; 2021: 432. ISBN 9785604415900 [In Russ.].
19. Shi K., Tian De-Cai, Li Zhi-Guo, Ducruet A.F., Lawton M.T., Shi Fu-Dong. Global brain inflammation in stroke. *Lancet Neurol*. 2019; 18 (11): 1058–1066. DOI: 10.1016/S1474-4422 (19)30078-X.
20. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
21. Herbert A.D., Carr A.M., Hoffmann E. FindFoci: a focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis. *PLoS One*. 2014; 9 (12): e114749. DOI: 10.1371/journal.pone.0114749.
22. Bolon B., Garman R., Jensen K., Krinke G., Stuart B. Best practices approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing. *Toxicol. Pathol.* 2006; 34 (3): 296–313. DOI: 10.1080/01926230600713269
23. Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S., Otani N., Osumi A., Toyooka T., Shima K. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol.* 2006; 112 (4): 471–481. DOI: 10.1007/s00401-006-0108-2
24. Bоровиков V. Statistica. The art of analyzing data on a computer. Publishing House «Piter»; 2003: 2nd ed.: 688 [In Russ.].
25. Volkova D.A., Kositsyn N.S., Goloborod'ko E.V., Loginova N.A., Svinov M.M. Electrophysiological correlations of morphological restructuring in experimental local ischemia of different severity in the rat sensorimotor cortex. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny= Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 155 (2): 233–236 [In Russ.]. DOI: 10.1007 / s10517-013-2128-y
26. Stepanov S.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Stepanov A.S., Gorbunova A.V. Reorganization of astrocytes of the neocortex of white rats after 20-minute occlusion of the common carotid arteries *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2019; 105 (5): 578–590 [In Russ.]. DOI: 10.1134/S086981391905011X
27. Semchenko V.V., Stepanov S.S., Bogolepov N.N. Brain synaptic plasticity (fundamental and applied aspects). M.: Direct Media; 2014 [In Russ.].

Поступила 2021.06.10

Received 2021.06.10