

Применение фотохимического тромбоза для моделирования ишемического инсульта (обзор)

И. В. Острова*, А. С. Бабкина, М. А. Любомудров, А. В. Гречко, А. М. Голубев

Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Для цитирования: Острова И. В., Бабкина А. С., Любомудров М. А., Гречко А. В., Голубев А. М. Применение фотохимического тромбоза для моделирования ишемического инсульта (обзор). *Общая реаниматология*. 2023; 19 (3): 54–65. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2023-3-54-65> [На русск. и англ.]

*Адрес для корреспонденции: Ирина Васильевна Острова, irinaostrova@mail.ru

Резюме

Понимание механизмов ишемического повреждения головного мозга имеет важное значение для разработки и совершенствования методов диагностики и лечения ишемического инсульта. Необходимость экспериментальных исследований обуславливает потребность в релевантных моделях фокальных повреждений ткани головного мозга. Одной из наиболее популярных является модель ишемического инсульта, основанная на методе фотохимического тромбоза.

Цель обзора — рассмотреть патогенетические основы и прикладное значение метода фотохимического тромбоза при моделировании ишемического инсульта.

Материал и методы. Поиск информации проводили с использованием баз данных PubMed и Google Scholar по ключевым словам «photothrombotic stroke» без языковых ограничений. Из более чем 600 источников для анализа выбрали 74, которые в наибольшей степени соответствовали цели обзора. Из них более 50% были опубликованы в течение последних пяти лет. Критерием исключения источников служило их несоответствие задачам обзора и малая информативность.

Результаты. Изложили особенности моделирования фототромботического инсульта, провели анализ преимуществ и недостатков модели, представили сведения о ее современных модификациях, методах исследования головного мозга при моделировании инсульта с помощью фототромбоза, обобщили информацию о механизмах развития повреждения мозга в рассматриваемой модели.

Заключение. Ряд преимуществ модели фототромботического инсульта: малая инвазивность, высокая воспроизводимость, возможность контроля объема инфаркта мозга и низкая летальность, обуславливают ее активное использование в экспериментальных исследованиях ишемического инсульта. Патологические процессы в головном мозге, моделируемые фотохимическим тромбозом, аналогичны процессам, происходящим при остром нарушении мозгового кровообращения по ишемическому типу. Поэтому данная модель позволяет изучать клеточные и молекулярные механизмы при ишемическом повреждении мозга и может быть полезна для поиска возможностей терапии инсульта.

Ключевые слова: *фокальная ишемия; фототромбоз; фототромботический инсульт; механизмы; повреждение головного мозга*

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Photochemically Induced Thrombosis as a Model of Ischemic Stroke

Irina V. Ostrova*, Anastasia S. Babkina, Maxim A. Lyubomudrov,
Andrey V. Grechko, Arkady M. Golubev

Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

Summary

Better understanding of ischemic brain injury mechanisms is important for the development and improvement of diagnostic and therapeutic modalities for management of ischemic stroke. As experimental studies are on demand, there's a need for relevant models of focal brain lesions. Photochemically induced thrombosis remains one of the most popular models of ischemic stroke.

The purpose of the review is to consider the pathogenesis and applicational relevance of the photochemical thrombosis in ischemic stroke modeling.

Material and methods. The information was searched using PubMed and Google Scholar databases and keywords «photothrombotic stroke» without language restrictions. 74 papers out of more than 600 sources were found the most relevant for the purpose of this review and selected for the analysis. Of these, more than 50% have been published in the last five years. The criterion for excluding a source was an inconsistency with the objectives of the review and low information content.

Results. We outlined a variety of features in modeling photothrombotic stroke, analyzed the advantages and disadvantages of the model, presented data on current method's modifications, as well as approaches to evaluation of brain lesions in ischemic stroke induced by photothrombosis, and summarized information about the mechanisms of brain damage induced in this model.

Conclusion. Several advantages of the photothrombotic stroke model, such as low invasiveness, high reproducibility, inherent control of brain infarction volume and low mortality, determine its active use in experimental studies of ischemic stroke. Pathological processes in the brain modeled by photochemical thrombosis are similar to the processes occurring in acute ischemic cerebral circulation events. Therefore, this model provides insights into cellular and molecular mechanisms of ischemic brain damage, and can be used for developing novel therapeutic approaches for management of ischemic stroke.

Keywords: focal ischemia; photothrombosis; photothrombotic stroke; mechanisms; brain damage

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

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

Инсульт является одной из основных причин смертности и инвалидности в мире [1]. Несмотря на огромное число исследований, терапевтические возможности для пациентов с инсультом остаются очень ограниченными. Это заставляет продолжать исследования тонких патофизиологических механизмов развития инсульта с целью разработки новых эффективных средств его профилактики и лечения.

Максимально близко патогенез острого ишемического инсульта воспроизводят модели фокальных повреждений головного мозга, чаще обусловленных окклюзией просвета средней мозговой артерии (СМА) [2]. Окклюзия сосуда, как правило, достигается за счет использования синтетических нитей небольшого диаметра, сгустка крови или протромботического препарата [3]. Одной из таких экспериментальных моделей является метод фотохимического тромбоза. Данная модель позволяет наиболее приближенно к естественным условиям имитировать события, инициируемые окклюзией сосудов мозга при инсульте у человека [4].

В большинстве исследований с помощью фототромботической окклюзии микрососудов воспроизводят неокортикальный инсульт. Хотя этот метод вызывает тромботический инсульт, он не имеет прямой клинической аналогии, так как наблюдается окклюзия главным образом небольших сосудов коры (менее 40 мкм), а не крупной артерии или ее ответвлений [3, 5]. Тем не менее, это относительно простой, неинвазивный способ генерации локального инфаркта в любой заранее выбранной области неокортекса у крысы или мыши, поэтому он активно используется в экспериментах по моделированию, диагностике и терапии ишемического инсульта [6].

Цель обзора — рассмотреть патогенетические основы и прикладное значение метода фотохимического тромбоза при моделировании ишемического инсульта.

Материал и методы

Поиск информации проводили с использованием баз данных PubMed и GoogleScholar по

ключевым словам «photothrombotic stroke» без языковых ограничений. Из более чем 600 источников для анализа выбрали 74, которые в наибольшей степени соответствуют цели обзора. Из них более 50% были опубликованы в течение последних пяти лет. Критерием исключения источников служило их несоответствие задачам обзора и малая информативность.

Моделирование фототромботического инсульта (ФТИ). Для индукции фототромбоза наркотизированным животным в кровеносную систему (внутривенно крысам или внутрибрюшинно мышам) вводят раствор светочувствительного красителя (чаще всего, это Бенгальский Розовый) [7]. Он почти не проникает в клетки и остается в сосудистой системе головного мозга. Голову животного фиксируют в стереотаксической установке, выполняют продольный разрез кожи и удаляют надкостницу. Для крыс может понадобиться трепанация черепа в нужном месте с помощью специального бура [8, 9]. Затем на определенном расстоянии от черепа устанавливают лазер, проводят облучение светом с длиной волны 520–560 нм в течение 10–30 мин, после чего операционную рану ушивают. Фотосенсибилизатор под воздействием интенсивного светового облучения производит активные формы кислорода, которые повреждают мембраны эндотелиоцитов кровеносных сосудов, что приводит к адгезии и агрегации тромбоцитов и, в конечном итоге, образованию тромбов в области облучения (рис. 1).

Локализация инсульта определяется местом облучения лазером, а его тяжесть — дозировкой фотосенсибилизатора и света [10, 12].

Преимущества и ограничения модели фототромбоза. В основе патогенеза модели ФТИ лежит тромбообразование вследствие нарушения целостности эндотелия с быстро прогрессирующим ишемическим инфарктом и гибелью клеток в относительно небольшом объеме коры. В отличие от данной модели, в других моделях инсульта требуются более инвазивные методы хирургии, такие как окклюзия средней мозговой артерии (СМА). При этом повреждается одновременно кора и подкорковые области, а область

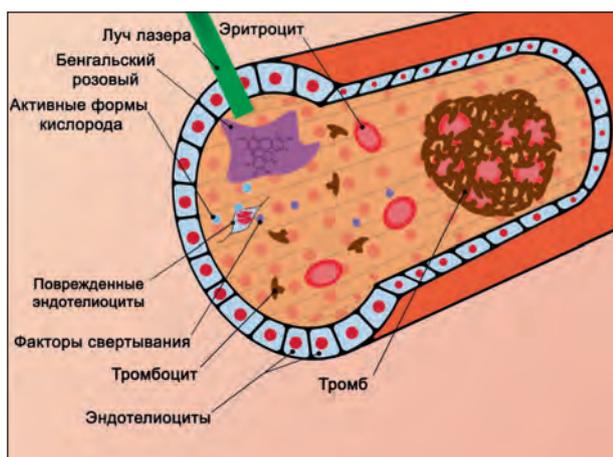


Рис. 1. Схематическое изображение механизма развития окклюзии кровеносного сосуда при фотоиндуцированном тромбозе.

ишемической полутени (пенумбры) хорошо выражена [5]. ФТИ является устоявшейся моделью для изучения фокальных ишемических повреждений мозга [12]. Патологические процессы в головном мозге, моделируемые фотохимическим тромбозом, аналогичны процессам, происходящим при остром нарушении мозгового кровообращения по ишемическому типу (атеротромботический, кардиоэмболический инсульт). Данная модель характеризуется высокой воспроизводимостью, возможностью контроля объема инфаркта мозга и низкой летальностью [10, 13–15]. Так, показано, что объем инфаркта зависит от интенсивности лазерного излучения [12, 16], а также — от продолжительности светового воздействия: увеличение времени экспозиции светового пучка с 15 до 20 мин приводит к увеличению объема инфаркта, что, однако, не усугубляет функциональные нарушения [17]. Модель ФТИ позволяет изучать динамику изменений сенсомоторных путей без влияния подкорковых областей [18]. Использование данной модели дает возможность получить статистически достоверные количественные данные о степени повреждения мозга и динамике патологических и репаративных процессов, оценивать нейропротекторное действие фармакологических препаратов [13].

Итак, достоинствами данной модели являются: минимальная инвазивность, хорошая воспроизводимость кортикального инсульта как у крыс, так и у мышей, низкая летальность среди животных, возможность выбора области воздействия, точность локализации местоположения ишемии, возможность контроля размеров и глубины ишемического повреждения [15, 19, 20].

К ограничениям модели можно отнести ее перманентный окклюзионный характер, что не позволяет использовать данную модель для

изучения механизмов ишемически-реперфузионного повреждения клеток, а также реперфузионной терапии [10]. Другая проблема заключается в том, что фототромбоз вызывает в равной степени как сосудистые, так и цитотоксические отеки, тогда как ишемический инсульт у человека вызывает преимущественно цитотоксические отеки, которые не сразу приводят к нарушению гематоэнцефалического барьера, что является существенным ограничением, затрудняющим экстраполяцию полученных с помощью этой модели данных [5, 10, 21]. Из-за быстрого и интенсивного развития отека тканей и некроза получается относительно небольшая зона пенумбры. Это является одним из ограничений фототромботической модели, которое нужно учитывать при оценке эффективности реперфузии [5, 22]. Ишемическая полутень, или пенумбра, была впервые определена Аструпом и его коллегами [23] на основе электрофизиологических наблюдений как область, в которой снижение мозгового кровотока превышает порог недостаточности электрической функции, но не порог мембранной недостаточности. Пенумбра представляет собой пространственно-динамическую область мозга с ограниченной жизнеспособностью, которая характеризуется сложными патофизиологическими изменениями, затрагивающими функции нейронов и глии [24]. Сегодня пенумбра в более широком смысле определяется как область ишемизированной ткани, которая функционально повреждена и подвержена риску инфаркта, но потенциально может быть сохранена [20].

Также одним из недостатков модели фототромбоза является то, что, как правило, у экспериментальных животных отсутствует неврологический дефицит, или его очень сложно диагностировать [18].

Для решения этих и других проблем разрабатываются модификации модели ФТИ и новые современные методы диагностики повреждений. В ранних версиях модели фототромбоз вызывал тяжелый инсульт с быстро развивающейся зоной ишемии и отсутствием зоны пенумбры, но более поздние модификации модели с использованием других параметров лазера позволили получить более широкую зону пенумбры [11]. Например, менее интенсивное, но продолжительное фотодинамическое действие на кору головного мозга крыс (диодный лазер; 532 нм, 60 мВт/см², 30 мин) приводило к возникновению пенумбры шириной 1,5–2 мм вокруг ядра инфаркта диаметром 3 мм, что было подтверждено данными гистологического и ультраструктурного исследований [11]. В работе U. I. Tuor и соавт. (2016) 5-минутное облучение коры головного мозга

крысы светом с длиной волны 555 нм и интенсивностью около 40 мВт/см² после введения 10 мг/кг Бенгальского Розового индуцировало небольшой инфаркт с умеренной и диффузной пенумброй [25]. Т. А. Clark с соавт. (2019) предложили модификацию модели фототромбоза у мышей с использования цифрового микроскопического прибора [20]. Осуществлялась окклюзия нескольких ветвей СМА на поверхности моторной коры, при этом ограничивался коллатеральный мозговой кровоток и перекрывались ветви передней мозговой артерии. Данная методика позволила расширить зону пенумбры и отсрочить спонтанную реперфузию целевых артерий подобно тому, как это происходит у людей. В этом заключалось ее отличие от традиционной фототромботической модели, которая чаще всего приводит к постоянной окклюзии артерий и относительно ограниченному коллатеральному кровотоку. В связи с этим, предложенная модификация может служить потенциальной моделью ишемии-реперфузии головного мозга [20].

Полагают, что устойчивость модели ФТИ к фибринолитической терапии связана с тем, что в результате фотохимической реакции в сосудах формируется богатый тромбоцитами, но бедный фибрином сгусток. Недавно было предложена модель фототромбоза у мышей, в которой для фотоактивации тромбоза в проксимальной ветви СМА была использована комбинация красителя Бенгальского Розового (50 мг/кг) и субтромботической дозы тромбина (80 ЕД/кг), что приводило к образованию обогащенных фибрином и чувствительных к tPA свертков крови. При этом, размеры и локализация инфаркта были постоянными, а внутривенное введение tPA (Альтеплаза, 10 мг/кг) в течение 2 ч после фотоактивации достоверно уменьшало размер инфаркта. Таким образом, модель ФТИ с усиленным тромбином может быть полезна для тестирования тромболитических методов лечения [26].

У. Kim с соавт. (2021) разработали систему фотохимической индукции тромбоза, которая может воспроизводить повреждение определенной области головного мозга у кролика. Основным преимуществом данной системы является возможность индуцировать ишемический инсульт локально в той части мозга, которая отвечает за те или иные функции [27]. На этой модели показано, что объем повреждения увеличивается через 24–48 ч после индукции фототромбоза и имеет тенденцию к снижению через 72 ч после индукции.

С. Qian с соавт. (2016) разработали модификацию модели ФТИ у мышей, в которой происходило повреждение не только коры, но и

базальных ганглиев [9]. В основе модели лежит окклюзия проксимальной СМА с помощью удобной лазерной системы с оптическим волокном. Среди других плюсов данной разработки — высокая воспроизводимость результатов, выраженная пенумбра, низкая летальность среди животных. В другом исследовании для получения инфаркта в подкорковых областях головного мозга у крыс использовали оптические волокна, стереотаксически имплантированные на хирургически выделенную проксимальную СМА [28]. На этой модели с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) продемонстрировали признаки пенумбры, а также возможности тромболитизиса с использованием тканевого активатора плазминогена rtPA [28].

S. M. Hosseinic с соавт. (2018) предложили метод индукции селективной унилатеральной ишемии гиппокампа у крыс с помощью модифицированной фототромботической модели [29]. Через 24 ч после воздействия при гистологическом исследовании гиппокампа в зоне ишемии выявляли сморщенные ядра и пикнотичные нейроны. Средний объем инфаркта составил 6,5%, при этом его размер не различался значительно у подопытных животных.

Одним из недостатков модели фототромбоза является то, что для получения доступа к сосудам коры головного мозга крысы применяют процедуру истончения черепа с помощью специального бура. Эта процедура может приводить к изменению внутричерепного давления, а также вызвать кровотечение во время операции или воспаление в послеоперационном периоде. Применение оптических методов визуализации тканей может помочь избежать этих проблем [12]. Одним из таких методов является оптическое просветление тканей. Оптическое просветление — временное снижение светорассеяния в биотканях, один из самых простых и эффективных методов решения проблемы увеличения глубины и качества изображений внутритканевых структур, а также повышения точности спектроскопической информации от глубоких слоев биотканей и крови. Оптическое иммерсионное просветление основывается на пропитывании (иммерсировании) ткани биосовместимым химическим (оптическим просветляющим) агентом, обладающим достаточно высоким показателем преломления, чтобы, проникая во внутритканевую жидкость, он мог согласовать показатели преломления рассеивателей и окружающей их среды. Для оптического просветления черепной кости в качестве усилителей проницаемости биоткани, в частности, используют глицерин, пропиленгликоль, этанол, тиазон и др. [30].

Недавно была предложена техника оптического просветления черепа у мышей без кра-

ниотомии, в ходе которой создается «оптическое окно», через которое может проникать световой луч [31]. На основе этой техники была создана контролируемая модель ишемического инсульта путем комбинации метода оптической очистки черепа *in vivo* и процедуры фототромбоза. При этом можно эффективно контролировать степень тромботической окклюзии и тяжесть инфаркта за счет изменения дозы света. «Оптическое окно» также можно использовать для непрерывного анализа крови и картирования потока. Данная модель представляет значительную ценность для исследований ишемического инсульта [12].

Методы исследования головного мозга при моделировании инсульта с помощью фототромбоза

Лучевые методы определения размеров и объема очага повреждения. В настоящее время для определения объема ишемического повреждения и выявления области пенумбры как в клинике, так и в эксперименте применяются различные технологии МРТ [9, 21, 27, 32, 33]. Объем очага повреждения определяют чаще всего с использованием T2-взвешенных МРТ изображений [9, 18]. Это эффективный неинвазивный метод оценки размера инфаркта в течение первых 2 недель после начала ишемии. Методы объемной микроскопии всего мозга, такие как серийная двухфотонная томография (STPT), могут дать подробную информацию о процессах повреждения и регенерации в мозге после инсульта [34]. Также для сравнения размера и расположения области поражения применяют автоматизированное картирование, анализ связей и гистологических структур с использованием атласа [35, 36]. Следует отметить, что, в отличие от других моделей инсульта, при ФТИ вазогенный отек, который соответствует сильному гиперинтенсивному сигналу на T2WI, проходит в течение первых 2 недель после инсульта и трансформируется в гипointенсивную полость [37].

Известно, что после инсульта происходит ремоделирование сосудов, окружающих область инфаркта мозга. Был разработан метод мониторинга изменений сосудистой структуры и кровотока с высокой пространственно-временной точностью после фототромботического инфаркта в моторной коре мышшей с использованием продольной двухфотонной и мультиэкспозиционной спекл-визуализации. Ремоделирование сосудистой структуры в перинфарктной коре развивалось в течение первых 2 нед после инсульта, при этом наблюдалась замена старых сосудов новыми и их избирательная

стабилизация. Эта сосудистая структурная пластичность совпадала с временной активацией программ транскрипции, имеющих отношение к ремоделированию сосудов, восстановлению перинфарктного кровотока и значительным улучшениям двигательной активности. Результаты подтвердили, что ремоделирование сосудов способствует восстановлению поведения после инсульта за счет восстановления кровотока в перинфарктной коре [38].

Электрофизиологические методы выявления области ишемического повреждения. Разрабатываются и другие способы для количественной оценки структурного повреждения головного мозга на модели ФТИ у крыс, в частности — с помощью электроэнцефалографии (ЭЭГ). Спектральный анализ выявил статистически значимую корреляцию относительных мощностей альфа, тета, дельта, отношения дельта/альфа, отношение (дельта + тета)/(альфа + бета) с объемом инсульта. Анализ слухового вызванного потенциала выявил значительную связь амплитуды и латентного периода с объемом инсульта. Эти результаты демонстрируют возможности ЭЭГ в качестве метода мониторинга повреждения головного мозга после инсульта [16].

Гисто- и иммуногистохимические методы оценки повреждения головного мозга при фототромботическом инсульте. Для определения объема повреждения также используют серийные срезы головного мозга, окрашенные с помощью раствора трифенилтетразолия хлорида (TTX) [7–9, 27, 39].

Для анализа и подтверждения повреждения мозга на клеточном уровне используют классические гистологические методы, такие как морфометрическое исследование фиксированных срезов головного мозга, окрашенных толуидиновым синим или крезидиновым фиолетовым (по Нисслю), или гематоксилином и эозином [9, 27, 40–42]. Была продемонстрирована корреляция между объемом повреждения, выявляемом с помощью МРТ и с помощью гистологических методов [9, 18, 27].

Для более точного анализа можно дополнительно использовать методы иммуногистохимического окрашивания, которые позволяют обнаружить нейроны и глиальные клетки и выявить их гибель или пролиферацию. Так, белок NeuN является маркером зрелых нейронов, он используется для визуализации и анализа зоны инфаркта, а также для оценки гибели нейронов [7, 17, 40, 42]. Для выявления зоны пенумбры используют такие маркеры, как *c-fos* и *heart shock protein 90* [9]. Маркер астроглии, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), выявляет границу между ишемической и неповрежденной областями и ис-

пользуется для визуализации активированных астроцитов, окружающих ядро инсульта в виде глиального рубца [18, 37, 41].

Нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) оценивают с использованием гистохимических красителей, в частности, Эванс Блю (Evans Blue) [17, 40]. Известно, что красители, связанные с сывороточным альбумином, могут преодолевать ГЭБ после ишемии. Краситель Evans Blue обычно используется для оценки нарушения ГЭБ из-за его быстрого связывания с сывороточным альбумином. Кроме него, можно использовать индоцианиновый зеленый (ICG), клинически доступный краситель, который связывается с белками сыворотки крови. Относительно недавно был предложен новый краситель — цвиттерионный БИК-флуорофор (ZW800-1). Его преимуществом является то, что он не связывается с сывороткой, обладает сверхнизким неспецифическим поглощением тканями и быстро выводится из организма посредством почечной фильтрации, при этом обеспечивает успешную визуализацию очага ишемического повреждения в ткани головного мозга, что было продемонстрировано на модели ФТИ [43].

Реакцию микроглии при повреждении мозга, вызванном ФТИ, оценивают с помощью метода иммуногистохимического окрашивания. В частности, для анализа степени активации микроглии, резидентных макрофагов головного мозга, используют антитела к CD68 и Iba1, которые являются маркерами макрофагов и клеток микроглии [7, 17, 41, 44, 45].

Молекулярные методы исследования. После ишемического инсульта повреждение клеток распространяется от очага инфаркта к окружающим тканям (область пенумбры). Для выявления белков, участвующих в механизмах альтерации нейронов и нейропротекции в пенумбре, исследуют изменения экспрессии белков с использованием микрочипов антител [46], наностринговых технологий [44] и др. Например, с помощью микрочипов антител изучали изменения экспрессии более 200 нейрональных белков в пенумбре через 4 или 24 ч после очагового фототромботического инфаркта. Наибольшие изменения были выявлены через 4 ч после повреждающего воздействия [46] и затрагивали белки путей передачи сигналов, белки, отвечающие за рост и направление аксонов; везикулярный транспорт; биосинтез нейромедиаторов; межклеточные взаимодействия; белки цитоскелета и другие. Известно, что эти белки участвуют как в процессах повреждения нейронов, так и в нейропротекции.

I. A. Choi с соавт. (2019) изучали изменения в экспрессии специфических генов в период от острой до хронической фазы (до 8 нед) инсульта

на модели фототромбоза у крыс. Через 1 нед после инсульта наблюдалось заметное снижение экспрессии генов нейротрансмиттерных синаптических и сигнальных путей, нейротрофических факторов, в то время как происходила активация молекул, связанных с апоптозом. Через 4 и 8 нед после инсульта усиливались процессы пролиферации клеток клеточной адгезии и воспаления [47].

Исследование экспрессии белков через 3 дня после фототромботической окклюзии СМА у мышей с помощью наностринговых технологий выявило в поврежденном полушарии различные регуляторные протеомные профили в соответствии с областями интереса: ишемическое ядро, перинфарктные ткани и перинфарктная нормальная ткань. Профиль основной границы продемонстрировал индукцию гибели нейронов, апоптоза, аутофагии, иммунореактивности к ранним дегенеративным белкам. В частности, на границе ядра выявлено снижение нейрональных белков Map2 и NeuN; увеличение белков аутофагии BAG3 и CTSD; увеличение белков микроглии и периферической иммунной инвазии Iba1, CD45, CD11b и CD39; и увеличение нейродегенеративных белков BACE1, APP, амилоида β 1-42, ApoE и таубелка S-199. В перинфарктной области выявили повышенные апоптотические и альтеративные протеомные профили с увеличением BAG3, GFAP и гиперфосфорилированного таубелка S-199 [44].

Рентгенофлуоресцентный анализ позволяет идентифицировать метаболически различные области нервной ткани, такие как очаг инфаркта и промежуточную область, окружающую очаг инфаркта, так называемую метаболическую полутень в раннем периоде или перинфарктную зону в более позднем периоде после инсульта. Исследования показали, что в очаге инфаркта уже через 1 ч после ФТИ у мышей происходит значительное снижение концентраций фосфора, серы и калия, при этом концентрация калия остается ниже нормы на протяжении месяца после повреждения. При этом повышается концентрация хлора и кальция, превышая физиологические параметры в течение всего исследованного периода. Значения концентраций элементов в пределах области полутени или перинфарктной зоне являются промежуточными между их значениями в ядре инфаркта и в нормальных тканях. Реагирующие клетки глии изменяют средний элементный состав очага инсульта, поэтому уровни элементов через 1 нед после инсульта и далее представляют собой комбинацию уровней элементов в этих клетках, а также в окружающей ткани. Результаты исследования показали, что терапевтиче-

ское окно для сохранения значительной части полутени находится в пределах первых 24 ч, после чего полутень расширяется, охватывая ранее незатронутую ткань. Изменение K^+ и Ca^{2+} является ранним признаком значительной дисфункции нервной ткани и ее необратимого повреждения. Отмечено, что общая площадь ткани, пораженной в острую фазу (включая очаг инфаркта и полутень), достигает максимума на 2-е сут после инсульта. Метод анализа метаболического состояния тканей полезен для отслеживания тяжести инсульта при наличии факторов риска инсульта, а также для количественной оценки эффективности лечения инсульта на животных моделях [48].

Морфологические изменения в головном мозге после ФТИ

Ранние морфологические изменения.

Морфологические исследования коры головного мозга крыс показали, что через 4 ч после ФТИ в ядре инфаркта происходит повреждение нейронов, глиальных клеток и капилляров, повреждается нейропил и развивается значительный внутриклеточный и вазогенный отек с формированием кистозных полостей [11, 49]. У мышей через час после фототромбоза проксимальной СМА (532 нм, 35 мВт, 2 мин) в зоне повреждения наблюдались процессы кардиализации и пикноза [9]. У крыс с фототромбозом сосудов сенсомоторной коры, вызванным более продолжительным лазерным облучением (532 нм, 64 мВт/см², 30 мин), через 1 ч в пределах ядра инсульта наблюдали начальные некротические изменения — повышение доли гиперхромных нейронов и появление пикнотичных нейронов. Через 24 ч морфологические изменения усиливались. Отмечали типичные ишемические изменения — массивную вакуолизацию нейропила, отек и дегенеративные изменения в нейронах, глиии и кровеносных сосудах. На ультраструктурном уровне наблюдали отек и разрушение митохондрий, эндоплазматического ретикулаума и диктиосом аппарата Гольджи, деграцию синапсов, дезорганизацию миелина, набухание нейронов и глиальных клеток, отек и разрушение компонентов капилляров. Морфологические изменения в области пенумбры были сходны с изменениями в самом некротическом ядре, но постепенно уменьшались к границе пенумбры, переходя в нормальную ткань коры головного мозга [11].

Если в ядре инсульта в основе повреждения клеток преобладает механизм некроза, то в пенумбре более важную роль играет апоптоз [11]. В участках пенумбры, прилегающих к зоне инфаркта, наибольший процент апоптотических клеток наблюдался через 24 ч после ФТИ, а

некротических — через 48 ч [50]. Репарация поврежденной ткани головного мозга начинается через 72 ч и заканчивается примерно к 28 сут после ФТИ [51].

Снижение плотности нейронов на границе инфаркта сопровождается ранней реакцией глиальных клеток. Уже через 3 ч после окклюзии сосудов можно обнаружить генерализованную микроглиальную активацию в коре ипсилатерального полушария. Активация астроцитов наблюдается в интактных частях ишемизированного полушария через 6 ч после окклюзии [24].

Активация клеток микроглии связана с изменением их морфологии и числа. Признаки, свидетельствующие об активации микроглии: увеличение числа клеток, увеличение площади сомы, уменьшение площади клеток и их радиуса, уменьшение количества первичных отростков, их длины, повышение плотности клеток [41]. Так, на модели фототромбоза у крыс иммуногистохимически выявили увеличение округлости Iba1+-клеток. Этот показатель достигал максимальных значений к 24 ч в перинфарктной ткани и сохранялся на повышенном уровне в течение 3 дней [42]. Доля площади Iba1-положительного материала в перинфарктной зоне заметно увеличивалась к 3-м сут, оставаясь повышенной на 7-е сут, что связано, в первую очередь, с увеличением числа клеток микроглии [37, 42]. В исследовании на модели ФТИ у мышей активация микроглии сохранялась до 84 дней после инсульта [41].

Вторичное повреждение. Локальные повреждения головного мозга вызывают отдаленные структурные и функциональные нарушения, которые способствуют поведенческому дефициту и влияют на процесс восстановления функций ЦНС. Вторичное повреждение клеток ЦНС — один из важнейших механизмов, который инициирует дополнительную избирательную гибель клеток в неишемических областях мозга с синаптическими связями с местом первичного повреждения и коррелирует с функциональным дефицитом и исходом [52–54]. Так, на модели фототромбоза у мышей была выявлена вторичная нейродегенерация в ипсилатеральных областях мозга, в частности, в сенсомоторной области таламуса [18, 54].

Фокальные ишемические поражения коры также могут вызывать отдаленное повреждение белого вещества головного мозга, но ограничиваются волокнами, связанными с областью первичного поражения. Так, на модели фокальной односторонней ФТИ сенсомоторной коры головного мозга у крыс наблюдалась выраженная альтерация аксонов в ипсилатеральной наружной капсуле, а также в отдаленных областях, включая контралатеральную наружную капсулу

и мозолистое тело. Дальнейший анализ трактографии волокон показал, что только волокна, имеющие прямые аксональные связи с областью первичного поражения, подвергались значительному повреждению. Эти волокна в основном представляют перилезиональные, межполушарные и подкорковые аксональные связи. Обнаружили, что объем первичного поражения может быть определяющим фактором дефицита двигательной функции [32].

У мышей с фототромботическим кортикальным инсультом также отмечено повреждение нейронов поля CA1 гиппокампа через 28 дней после воздействия по сравнению с ложнопериворванными животными [40].

Кроме того, на модели ФТИ в первичной моторной коре у крыс был установлен факт вторичной гибели дофаминергических нейронов среднего мозга [55]. Вторичная дофаминергическая дегенерация после инсульта связана с неблагоприятными исходами, такими как постинсультная депрессия или паркинсонизм [45].

Механизмы фототромботического повреждения мозга

Процессы повреждения нервной ткани в ядре ФТИ аналогичны таковым в других моделях инсульта и при инсульте у человека. Однако существуют некоторые отличия (рис. 2).

Модель ФТИ характеризуется быстро развивающимся ишемическим повреждением клеток мозга. Однако в отличие от модели окклюзии СМА, где агрегация тромбоцитов и нарушения в системе свертывания крови являются основными патогенными факторами, повреждение нервной ткани при фототромбозе может быть обусловлено и другими причинами [11]. Патологические процессы в ядре ФТИ включают ряд взаимосвязанных событий: прямое фотодинамическое повреждение клеток, сигнальные и метаболические процессы, приводящие к гибели клеток, подобные тем, которые развиваются и при других формах ишемического инсульта, а также последствия отека ткани. Как и при других видах инсульта, в результате окклюзии сосудов и уменьшения кровотока в ядре инфаркта снижается и прекращается доставка кислорода и глюкозы, ингибируется окислительное фосфорилирование и прекращается выработка АТФ [56]. Дефицит АТФ приводит к быстрому выходу из строя энергозависимых ионных насосов и каналов, потере мембранного потенциала и деполяризации нейронов и глии, и притоку Ca^{2+} в клетки [57]. В результате происходит повышение концентрации потенциально токсичных возбуждающих нейротрансмиттеров в ткани мозга. Массивное высвобождение глутамата и аспартата из поврежденных нейронов вызывает

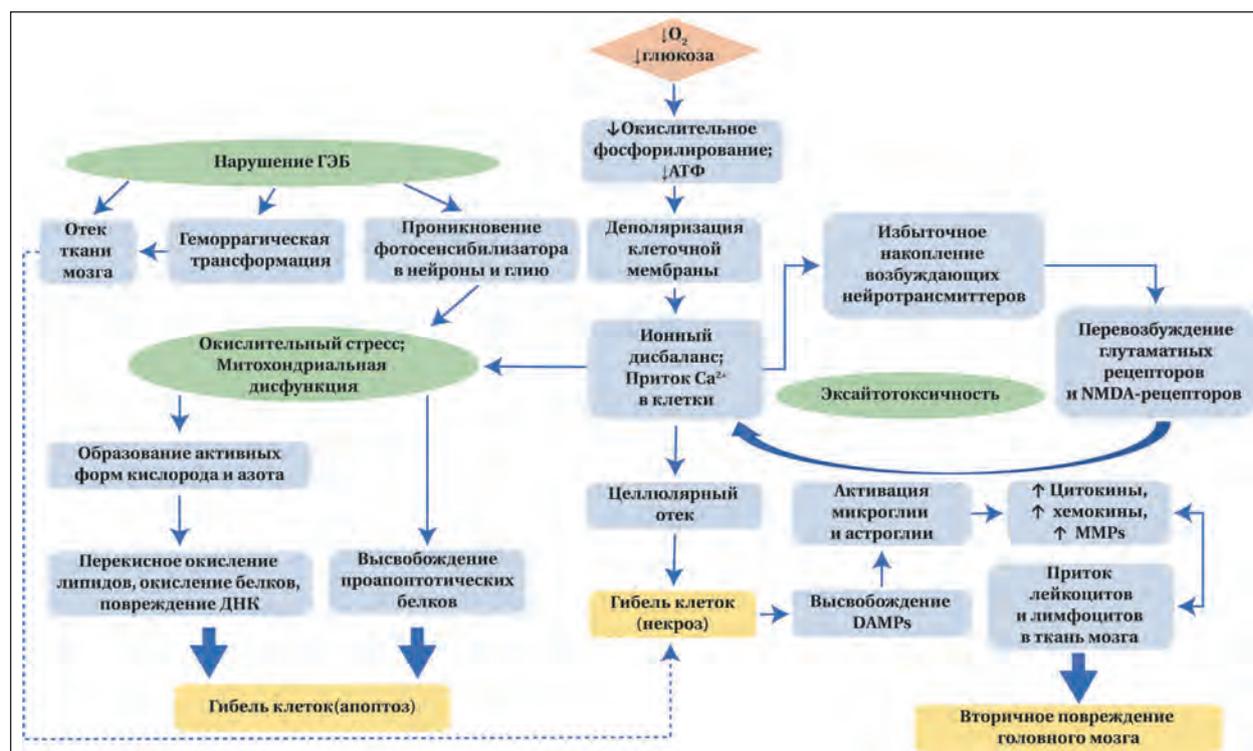


Рис. 2. Сигнальные пути повреждения клеток при фототромботическом инсульте.

Примечание. DAMPs — молекулы молекулярного паттерна повреждения; NMDA — N-метил-D-аспартат; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; MMPs — матриксные металлопротеиназы; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

перевозбуждение клеточных рецепторов, что приводит к открытию кальциевых каналов и притоку ионов кальция и натрия в нейроны. Это вызывает пассивный вход воды в клетки и их отек. Происходит лизис клеток, в первую очередь в ишемическом ядре [5]. Кроме того, большое количество ионов Ca^{2+} активирует гидролитические ферменты, такие как нуклеазы, липазы и протеиназы, которые способствуют разрушению клеток в ядре инсульта [1]. Это так называемая эксайтотоксичность.

При инсульте очень быстро нарушается целостность ГЭБ, вызванная оксидативным дистрессом, повышением уровня матриксных металлопротеиназ, цитокинов, разрушением плотных контактов и белков интегринов — трансмембранных гликопротеиновых рецепторов. Это приводит к формированию вазогенного отека и геморрагической трансформации [58]. В опытах T. Kuroiwa с соавт. (2013) нарушение ГЭБ наблюдалось в мозге крыс через 4 ч после ФТИ базальных ганглиев. Оно достигало максимума на 1-й день, и полностью исчезало через 6 дней после ФТИ [28]. Через четыре-шесть часов после инсульта происходит приток белков сыворотки крови, что также приводит к вазогенным отекам [21]. Показано, что при ФТИ в течение первого часа после воздействия светом происходит массивная утечка плазмы крови через стенки сосудов в ткань мозга. Этот процесс почти сохраняется через 4 ч, но в области пенумбры остается и через 24 ч после фототромбоза. Таким образом, не только образование тромбов, но и выход плазмы крови через стенки поврежденных сосудов играют важную роль в патогенезе ФТИ [11, 59].

Из-за нарушенного ГЭБ молекулы фотосенсибилизаторов проникают в глию и нейроны, что способствует прямому фотодинамическому повреждению клеток мозга [60].

Повышение внутриклеточного кальция приводит к повышенному образованию свободных радикалов кислорода, которые вызывают перекисное окисление липидов, окисление белков и повреждение нуклеиновых кислот [61]. Ионы кальция вызывают открытие митохондриальных пор и выход в цитозоль проапоптотических белков. Нарушение целостности митохондриальной мембраны и митохондриальная дисфункция приводят к выработке активных форм кислорода и азота [11]. Именно митохондриям принадлежит центральная роль в развитии окислительного стресса, в результате которого происходит повреждение клеток и вещества головного мозга [62]. В целом, интенсивный окислительный стресс в ядре инфаркта вызывает некроз клеток, а умеренный в пенумбре — в основном приводит к апоптозу [63].

Гибель нейронов запускает различные каскады реакций, в том числе высвобождение молекул молекулярного паттерна повреждения (DAMP), которые инициируют активацию клеток микроглии, астроглии, а также высвобождение биологически активных веществ, цитокинов, хемокинов и других факторов, которые могут оказывать влияние на окружающие ткани [64, 65]. Цитокины и хемокины привлекают к месту повреждения лейкоциты и лимфоциты, которые проникают в вещество мозга благодаря нарушенному ГЭБ [66].

Клетки микроглии могут активироваться в течение нескольких минут после ишемии, продуцируя биологически активные вещества, такие как интерлейкин- 1β (IL- 1β) и фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α). На модели ФТИ у мышей было показано, что нейроны в центре повреждения погибают уже через 2 ч, и это сопровождается активацией микроглии и астроцитов [67]. Максимальная активность микроглии наблюдается через два-три дня после повреждения и сохраняется в течение нескольких недель после него [21, 40].

Ишемия также вызывает активацию астроцитов. После ФТИ у крыс астроглиальная реакция инициируется от 4 ч до 1 сут и достигает максимума на 4-е сут, и сохраняется до 28 дней [15, 40, 68]. Цитокины, выделяемые нейронами и глиальными клетками после ишемии, приводят к реактивной гиперплазии астроцитов. Активированные астроциты начинают продуцировать моноцитарный хемотоксический протеин-1, IL- 1β , GFAP, виментин и нестин, что приводит к реактивному глиозу и образованию глиальных рубцов [69, 70]. Кроме того, астроциты выделяют металлопротеиназы (MMPs), которые разрушают белки базальной мембраны и плотных контактов ГЭБ, что способствует повышению его проницаемости и проникновению в ткань мозга лейкоцитов крови [66]. Однако астроцитоз может играть положительную роль в репаративных процессах. Недавно на модели ФТИ у мышей получены доказательства того, что реактивные астроциты являются критическими медиаторами ремоделирования сосудов, которое имеет важное значение для функционального восстановления [48].

Лейкоциты и лимфоциты продуцируют нейротоксические белки, такие как индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS) и MMPs, активные формы кислорода и провоспалительные факторы [71, 72], что обуславливает вторичное повреждение мозга [66].

Роль в постишемическом повреждении мозга лимфоцитов, также как и микроглии и астроглии, далеко не однозначна и требует

дальнейшего изучения, что важно для разработки будущих стратегий иммуномодулирующей терапии [8, 72–74].

Полагают, что прогрессирование вторичного повреждения головного мозга связано с активацией клеток глии, выработкой биологически активных веществ, а тяжесть и исход инсульта зависит от его выраженности [75, 76]. Выявлена разница в характере процессов, которые развиваются в областях, прилежащих к области некроза (кора), и в подкорковых структурах мозга (гиппокамп) [40]. Процессы повреждения нейронов в периинфарктной области развиваются раньше и затухают со временем, чем объясняется восстановление двигательных функций. В гиппокампе эти процессы длются в течение очень большого периода (3 мес), чем объясняется сохранение когнитивной дисфункции [40].

Литература

1. Paul S., Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies. *Exp Neurol*. 2021; 335: 113518. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113518. PMID: 33144066
2. Golubev A.M. Models of ischemic stroke (Review). *General Reanimatology*. 2020; 16 (1): 59–72. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-1-59-72
3. Тюренков И. Н., Куркин Д. В., Литвинов А. А., Логвинова Е. А., Морковин Е. И., Бакулкин Д. А., Волотова Е. В. Методы моделирования острых нарушений мозгового кровообращения, применяемые при проведении доклинических исследований церебропротекторов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 1: 186–197. [Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Litvinov A.A., Logvinova E.A., Morkovin E.I., Bakulkin D.A., Volotova E.V. Acute stroke models used in preclinical research. *Drug Development & Registration/Razrabotka i Registraciya Lekarnstvennykh Sredstv*. 2018; (1): 186–197. (In Russ.)]
4. Weber R.Z., Grönnert L., Mulders G., Maurer M.A., Tackenberg C., Schwab M.E., Rust R. Characterization of the blood brain barrier disruption in the photothrombotic stroke model. *Front Physiol*. 2020; 11: 586226. DOI: 10.3389/fphys.2020.586226. PMID: 33262704.
5. Carmichael S.T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*. 2005; 2 (3): 396–409. DOI: 10.1602/neurorx.2.3.396.
6. Llovera G., Pinkham K., Liesz A. Modeling stroke in mice: focal cortical lesions by photothrombosis. *J Vis Exp*. 2021; (171). DOI: 10.3791/62536. PMID: 34028443
7. Eid M., Dzreyan V., Demyanenko S. Sirtuins 1 and 2 in the acute period after photothrombotic stroke: expression, localization and involvement in apoptosis. *Front. Physiol*. 2022; 13: 782684. DOI: 10.3389/fphys.2022.782684. PMID: 35574497
8. Nucci M.P., Oliveira F.A., Ferreira J.M., Pinto Y.O., Alves A.H., Mamani J.B., Nucci L.P. et al. Effect of cell therapy and exercise training in a stroke model, considering the cell track by molecular image and behavioral analysis. *Cells*. 2022; 11 (3): 485. DOI: 10.3390/cells11030485. PMID: 35159294
9. Qian C., Li P.C., Jiao Y., Yao H.H., Chen Y.C., Yang J., Ding J. et al. Precise characterization of the penumbra revealed by MRI: a modified photothrombotic stroke model study. *PLoS One*. 2016; 11 (4): e0153756. DOI: 10.1371/journal.pone.0153756. PMID: 27093556
10. Macrae I.M. Preclinical stroke research—advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischemia. *Br J Pharmacol*. 2011; 164 (4): 1062–1078. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x. PMID: 21457227
11. Узденский А. Б., Демьяненко С. В. Фототромботический инсульт. Биохимия пенумбры. 2016. Издательство: Южный федеральный университет [Uzdensky A. B., Demyanenko S. V. Photothrombotic stroke. Biochemistry of penumbra. 2016. Publisher: Southern Federal University]. eLibrary: 29456163; EDN: YUPIBL
12. Hu Sh., Wu G., Wu B., Du Zh., Zhang Yi. Rehabilitative training paired with peripheral stimulation promotes motor recovery after ischemic cerebral stroke. *Exp Neurol*. 2021; 349: 113960. DOI: 10.1016/j.expneurol.2021.113960. PMID: 34953896
13. Барсков И.В., Тактаров В.Г., Иванова М.В., Сергеев В.А., Павлова Е. А. Морфологическое исследование очага фокального ишемического повреждения коры головного мозга крыс на модели лазерного фотоиндуцированного тромбоза. *Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье*. 2016. 3 (23): 39–43. [Barskov I.V., Taktarov V.G., Ivanova M.V., Sergeev V.A., Pavlova E. A. Morphological studies of focus of focal cerebral cortex ischemic injury of rats on the laser photoinduced thrombosis model. *Bulletin of the Medical Institute «Reaviz»: Rehabilitation, Doctor and Health/Vestnik Meditsinskogo Instituta «Reaviz»: Reabilitatsiya, Vrach i Zdorovie*. 2016. 3 (23): 39–43. (in Russ.)]. eLIBRARY ID: 27631994. EDN: XGRLHZ
14. Yao Z., Yazdan-Shahmorad A.A. Quantitative model for estimating the scale of photochemically induced ischemic stroke. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2018; 2018: 2744–2747. DOI: 10.1109/EMBC.2018.8512880. PMID: 30440969
15. Ota Y., Kubota Y., Hotta Y., Matsumoto M., Matsuyama N., Kato T., Hamakawa T. et al. Change in the central control of the bladder function of rats with focal cerebral infarction induced by photochemically-induced thrombosis. *PLoS One*. 2021; 16 (11): e0255200. DOI: 10.1371/journal.pone.0255200. PMID: 34752461
16. Yoo H.J., Ham J., Duc N.T., Lee B. Quantification of stroke lesion volume using epidural EEG in a cerebral ischemic rat model. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 2308. DOI: 10.1038/s41598-021-81912-2. PMID: 33504903
17. Knezic A., Broughton B.R.S., Widdop R.E., McCarthy C.A. Optimising the photothrombotic model of stroke in the C57Bl/6 and FVB/N strains of mouse. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 7598. DOI: 10.1038/s41598-022-11793-6. PMID: 35534531.
18. Aswendt M., Pallast N., Wieters F., Baues M., Hoehn M., Fink G.R. Lesion size- and location-dependent recruitment of contralesional thalamus and motor cortex facilitates recovery after stroke in mice. *Transl Stroke Res*. 2021; 12 (1): 87–97. DOI: 10.1007/s129. PMID: 32166716
19. Sommer C.J. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017; 133 (2): 245–261. DOI: 10.1007/s00401-017-1667-0. 2017. PMID: 28064357.
20. Clark T.A., Sullender C., Kazmi S.M., Speetles B.L., Williamson M.R., Palmberg D.M., Dunn A.K. et al. Artery targeted photothrombosis widens the vascular penumbra, instigates peri-infarct neovascularization and models forelimb impairments. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 2323. DOI: 10.1038/s41598-019-39092-7. PMID: 30787398.
21. Barthels D., Das H. Current advances in ischemic stroke research and therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020; 1866 (4): 165260. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.09.012. PMID: 31699365.
22. Uzdensky A.B. Photothrombotic stroke as a model of ischemic stroke. *Transl Stroke Res*. 2018; 9 (5): 437–451. DOI: 10.1007/s12975-017-0593-8. 2017. PMID: 29188434.
23. Astrup J., Siesjö B.K., Symon L. Thresholds in cerebral ischemia — the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981; 12 (6): 723–725. DOI: 10.1161/01.str.12.6.723. PMID: 6272455
24. Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra—revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol*. 1998; 18 (6): 621–638. DOI: 10.1023/a:1020629818207. PMID: 9876870
25. Tuor U.L., Deng Q., Rushforth D., Foniok T., Qiao M. Model of minor stroke with mild peri-infarct ischemic injury. *J. Neurosci Methods*.

- 2016; 268: 56–65. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2016.04.025. PMID: 27139736
26. Kuo Y.M., Sun Y.Y., Kuan C.Y. A Fibrin-enriched and tPA-sensitive photothrombotic stroke model. *J Vis Exp.* 2021; (172). DOI: 10.3791/61740. PMID: 34152310.
27. Kim Y., Lee Y.B., Bae S.K., Oh S.S., Choi J.R. Development of a photochemical thrombosis investigation system to obtain a rabbit ischemic stroke model. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 5787. DOI: 10.1038/s41598-021-85348-6. PMID: 33707580.
28. Kuroiwa T., Xi G., Hua Y., Nagaraja T.N., Fenstermacher J.D., Keep R.F. Development of a rat model of photothrombotic ischemia and infarction within the caudoputamen. *Stroke.* 2009; 40 (1): 248–253. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.527853. PMID: 19038913.
29. Hosseini S.M., Poubadie H.G., Naderi N., Sayyah M., Zibaii M.I. Photothrombotically induced unilateral selective hippocampal ischemia in rat. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2018; 94 (Pt 1): 77–86. DOI: 10.1016/j.vascn.2018.06.003. 2018 PM. PMID: 29906509
30. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Семьячкина-Глушковская О.В., Тучин В.В. Оптическое просветление черепной кости многокомпонентными иммерсионными растворами и визуализация церебрального венозного кровотока. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика.* 2017; 17 (2): 98–110. [Genina E.A., Bashkatov A.N., Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Tuchin V.V. Optical illumination of the cranial bone with multi-component immersion solutions and visualization of cerebral venous blood flow. *News of Saratov University. A New Series. Physics Series/Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya Seriya. Seriya Fizika.* 2017; 17 (2): 98–110. (in Russ.).] DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-98-110
31. Zhang C., Feng W., Zhao Y., Yu T., Li P., Xu T., Luo Q. et al. A large, switchable optical clearing skull window for cerebrovascular imaging. *Theranostics.* 2018; 8 (10): 2696–2708. DOI: 10.7150/thno.23686. PMID: 29774069.
32. Li Z., Gao H., Zeng P., Jia Y., Kong X., Xu K., Bai R. Secondary degeneration of white matter after focal sensorimotor cortical ischemic stroke in rats. *Front Neurosci.* 2021; 14: 611696. DOI: 10.3389/fnins.2020.611696. PMID: 33536869
33. Wahl A.S., Correa D., Imobersteg S., Maurer M.A., Kaiser J., Augath M.A., Schwab M.E. Targeting therapeutic antibodies to the CNS: a comparative study of intrathecal, intravenous, and subcutaneous anti-Nogo A antibody treatment after stroke in rats. *Neurotherapeutics.* 2020; 17 (3): 1153–1159. DOI: 10.1007/s13311-020-00864-z. PMID: 32378027.
34. Poinssatte K., Betz D., Torres V.O., Ajay A.D., Mirza S., Selvaraj U.M., Plautz E.J. et al. Visualization and quantification of post-stroke neural connectivity and neuroinflammation using serial two-photon tomography in the whole mouse brain. *Front Neurosci.* 2019; 13: 1055. DOI: 10.3389/fnins.2019.01055. PMID: 31636534.
35. Pallast N., Diedenhofen M., Blaschke S., Wieters F., Wiedermann D., Hoehn M., Fink R.G. et al. Processing pipeline for atlas-based imaging data analysis of structural and functional mouse brain MRI (AIDAmri). *Front Neuroinform.* 2019; 13: 42. DOI: 10.3389/fninf.2019.01055. PMID: 31231202
36. Pallast N., Wieters F., Fink G.R., Aswendt M. Atlas-based imaging data analysis tool for quantitative mouse brain histology (AIDAHisto). *J Neurosci Methods.* 2019; 326: 108394. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2019.108394. PMID: 31415844
37. Li H., Zhang N., Lin H.Y., Yu Y., Cai Q.Y., Ma L., Ding S. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice. *BMC Neurosci.* 2014; 15: 58. DOI: 10.1186/1471-2202-15-58. PMID: 24886391
38. Williamson M.R., Franzen R.L., Fuertes C.J.A., Dunn A.K., Drew M.R., Jones T.A. A window of vascular plasticity coupled to behavioral recovery after stroke. *J Neurosci.* 2020; 40 (40): 7651–7667. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1464-20.2020. PMID: 32873722
39. Aamir R., Fyffe C., Korin N., Lawrence D.A., Su E.J., Kanapathipillai M. Heparin and arginine based plasmin nanoformulation for ischemic stroke therapy. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22 (21): 11477. DOI: 10.3390/ijms222111477.
40. Zhou M.Y., Zhang Y.J., Ding H.M., Wu W.F., Cai W.W., Wang Y.Q., Geng D.Q. Diprotin A TFA exerts neurovascular protection in ischemic cerebral stroke. *Front Neurosci.* 2022; 16: 861059. DOI: 10.3389/fnins.2022.861059. PMID: 35615279.
41. Sanchez-Bezanilla S., Hood R.J., Collins-Praino L.E., Turner R.J., Walker F.R., Nilsson M., Ong L.K. More than motor impairment: a spatiotemporal analysis of cognitive impairment and associated neuropathological changes following cortical photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2021; 41 (9): 2439–2455. DOI: 10.1177/0271678X211005877 2021. PMID: 33779358.
42. Yew W.P., Djukic N.D., Jayaseelan J.S.P., Woodman R.J., Muyderman H., Sims N.R. Differential effects of the cell cycle inhibitor, olomoucine, on functional recovery and on responses of peri-infarct microglia and astrocytes following photothrombotic stroke in rats. *J Neuroinflammation.* 2021; 18 (1): 168. DOI: 10.1186/s12974-021-02208-w. PMID: 34332596.
43. Lee S., Lim W., Ryu H.W., Jo D., Min J.J., Kim H.S., Hyun H. ZW800-1 for assessment of blood-brain barrier disruption in a photothrombotic stroke model. *Int J Med Sci.* 2017; 14 (13): 1430–1435. DOI: 10.7150/ijms.22294. PMID: 29200957
44. Noll J.M., Augello C.J., Kürüm E., Pan L., Pavenko A., Nam A., Ford B.D. Spatial analysis of neural cell proteomic profiles following ischemic stroke in mice using high-plex digital spatial profiling. *Mol Neurobiol.* 2022; 59 (12): 7236–7252. DOI: 10.1007/s12035-022-03031-x. PMID: 36151369
45. Frase S., Löffler F., Hosp J.A. Enhancing post-stroke rehabilitation and preventing exo-focal dopaminergic degeneration in rats—a role for substance P. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (7): 3848. DOI: 10.3390/ijms23073848. PMID: 35409207.
46. Uzdensky A., Demyanenko S., Fedorenko G., Lapteva T., Fedorenko A. Protein profile and morphological alterations in penumbra after focal photothrombotic infarction in the rat cerebral cortex. *Mol Neurobiol.* 2017; 54 (6): 4172–4188. DOI: 10.1007/s12035-016-9964-5. PMID: 27324898.
47. Choi I.A., Yun J.H., Kim J.H., Kim H.Y., Choi D.H., Lee J. Sequential transcriptome changes in the penumbra after ischemic stroke. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (24): 6349. DOI: 10.3390/ijms20246349. PMID: 31888302
48. Pushie M.J., Sylvain N.J., Hou H., Caine S., Hackett M.J., Kelly M.E. Tracking elemental changes in an ischemic stroke model with X-ray fluorescence imaging. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 17868. DOI: 10.1038/s41598-020-74698-2. PMID: 33082455
49. Gu W.G., Brännström T., Jiang W., Wester P. A photothrombotic ring stroke model in rats with remarkable morphological tissue recovery in the region at risk. *Exp Brain Res.* 1999; 125 (2): 171–183. DOI: 10.1007/s002210050672. PMID: 10204770.
50. Hu X., Johansson I.M., Brännström T., Olsson T., Wester P. Long-lasting neuronal apoptotic cell death in regions with severe ischemia after photothrombotic ring stroke in rats. *Acta Neuropathol.* 2002; 104 (5): 462–470. DOI: 10.1007/s00401-002-0579-8. PMID: 12410394
51. Gu W., Brännström T., Wester P. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000; 20 (8): 1166–1173. DOI: 10.1097/00004647-200008000-00002. PMID: 10950377.
52. Zhang J., Zhang Y., Xing S., Liang Z., Zeng J. Secondary neurodegeneration in remote regions after focal cerebral infarction: a new target for stroke management? *Stroke.* 2012; 43 (6): 1700–1705. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.632448. PMID: 22492515
53. Pietrogrande G., Zalewska K., Zhao Z., Abdolhosseini M., Chow W.Z., Sanchez-Bezanilla S., Ong L.K. et al. Low oxygen post conditioning prevents thalamic secondary neuronal loss caused by excitotoxicity after cortical stroke. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 4841. DOI: 10.1038/s41598-019-39493-8. PMID: 30890719.
54. Necula D., Cho F.S., He A., Paz J.T. Secondary thalamic neuroinflammation after focal cortical stroke and traumatic injury mirrors corticothalamic functional connectivity. *J Comp Neurol.* 2022; 530 (7): 998–1019. DOI: 10.1002/cne.25259. PMID: 34633669.
55. Hosp J.A., Greiner K.L., Arellano L.M., Roth F., Löffler F., Reis J., Fritsch B. Progressive secondary exo-focal dopaminergic neurodegeneration occurs in not directly connected midbrain nuclei after pure motor-cortical stroke. *Exp Neurol.* 2020; 327: 113211. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113211. PMID: 31987834
56. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology.* 2008; 55 (3): 289–309. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.023. PMID: 18639906
57. Leichsenring A., Riedel T., Qin Y., Rubini P., Illes P. Anoxic depolarization of hippocampal astrocytes: possible modulation of P2X7 receptors. *Neurochem Int.* 2013; 62 (1): 15–22. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.11.002. PMID: 23147683
58. Abdullahi W., Tripathi D., Ronaldson P.T. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018; 315 (3): C343–C356. DOI: 10.1152/ajpcell.00095.2018. PMID: 29949404
59. Hoff E.I., oude Egbrink M.G., Heijnen V.V., Steinbusch H.W., van Oostenbrugge R.J. In vivo visualization of vascular leakage in photochemically induced cortical infarction. *J Neurosci Methods.* 2005; 141 (1): 135–141. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.06.004. PMID: 15585297.
60. Hirschberg H., Uzal F.A., Chighvinadze D., Zhang M. J., Peng Q., Madsen S. J. Disruption of the blood-brain barrier following ALA-mediated photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2008; 40 (8): 535–542. DOI: 10.1002/lsm.20670. PMID: 18798293
61. Sun L., Strelow H., Mies G., Veltkamp R. Oxygen therapy improves energy metabolism in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2011; 1415: 103–108. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.07.064. PMID: 21872850
62. Qin C., Yang S., Chu Y.H., Zhang H., Pang X.W., Chen L., Zhou L.Q. et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7 (1): 215. DOI: 10.1038/s41392-022-01064-1. PMID: 35794095.

63. Chen H., Yoshioka H., Kim G.S., Jung J.E., Okami N., Sakata H., Maier C.M. et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14 (8): 1505–1517. DOI: 10.1089/ars.2010.3576. PMID: 20812869
64. Banjara M., Ghosh C. Sterile neuroinflammation and strategies for therapeutic intervention. *Int J Inflamm*. 2017; 2017: 8385961. DOI: 10.1155/2017/8385961. PMID: 28127491
65. Gülke E., Gelderblom M., Magnus T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018; 11: 1756286418774254. DOI: 10.1177/1756286418774254. PMID: 29854002.
66. Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R., Jalal F.Y., Rosenberg G.A. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2019; 16 (1): 142. DOI: 10.1186/s12974-019-1516-2. PMID: 31291966
67. Gorlamandala N., Parmar J., Craig A.J., Power J.M., Moorhouse A.J., Krishnan A.V., Housley G.D. Focal ischaemic infarcts expand faster in cerebellar cortex than cerebral cortex in a mouse photothrombotic stroke model. *Transl Stroke Res*. 2018; 9 (6): 643–653. DOI: 10.1007/s12975-018-0615-1. PMID: 29455391
68. Nowicka D., Rogozinska K., Aleksy M., Witte O.W., Skangiel-Kramska J. Spatiotemporal dynamics of astroglial and microglial responses after photothrombotic stroke in the rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2008; 68 (2): 155–168. PMID: 18511952.
69. Hennessy E., Griffin E.W., Cunningham C. Astrocytes are primed by chronic neurodegeneration to produce exaggerated chemokine and cell infiltration responses to acute stimulation with the cytokines IL-1 β and TNF- α . *J Neurosci*. 2015; 35 (22): 8411–8422. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2745-14.2015. PMID: 26041910
70. Wang H., Song G., Chuang H., Chiu C., Abdelmaksoud A., Ye Y., Zhao L. Portrait of glial scar in neurological diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018; 31: 2058738418801406. DOI: 10.1177/2058738418801406. PMID: 30309271
71. Clausen B.H., Lambertsen K.L., Babcock A.A., Holm T.H., Dagnaes-Hansen F., Finsen B. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *J Neuroinflammation*. 2008; 5: 46. DOI: 10.1186/1742-2094-5-46. PMID: 18947400
72. Jin R., Liu L., Zhang S., Nanda A., Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013; 6 (5): 834–851. DOI: 10.1007/s12265-013-9508-6. PMID: 24006091
73. Xie L., Yang S.H. Interaction of astrocytes and T cells in physiological and pathological conditions. *Brain Res*. 2015; 1623: 63–73. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.03.026. PMID: 25813828
74. Qiu Y.M., Zhang C.L., Chen A.Q., Wang H.L., Zhou Y.F., Li Y.N., Hu B. Immune cells in the BBB disruption after acute ischemic stroke: targets for immune therapy? *Front Immunol*. 2021; 12: 678744. DOI: 10.3389/fimmu.2021.678744. PMID: 34248961
75. Chamorro A., Meisel A., Planas A.M., Urra X., van de Beek D., Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8 (7): 401–410. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.98. PMID: 22664787.
76. Veltkamp R., Gill D. Clinical trials of immunomodulation in ischemic stroke. *Neurotherapeutics*. 2016; 13 (4): 791–800. DOI: 10.1007/s13311-016-0458-y. PMID: 27412685

Поступила 25.01.2023

Принята в печать 25.04.2023