

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Колпакова М.Э.¹, Бельдиман Л.Н.¹, Яковлева А.А.¹, Кирик О.В.², Коржевский Д.Э.², Власов Т.Д.¹

Применение иммуногистохимической реакции на нестин для определения размеров повреждения мозга при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8;

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Павлова, д. 12

Существенной проблемой при оценке развивающегося повреждения при экспериментальном исследовании ишемии мозга является отсутствие стандартизированных методических подходов для быстрого и точного определения зоны деструкции при использовании парафиновых срезов. **Цель** исследования – разработка нового подхода к оценке объема повреждения головного мозга при фокальной транзиторной ишемии в бассейне средней мозговой артерии. **Методика.** Проводили морфологическое исследование серийных фронтальных парафиновых срезов конечного мозга. В качестве обзорной окраски использовали окраску 0,1% водным раствором крезилового фиолетового по Нисслию. Для оценки популяции активированных глиальных клеток использовали иммуноцитохимическую реакцию на нестин, для оценки жизнеспособности нейронов использовали иммуноцитохимическую реакцию на NeuN. Иммуноцитохимическую реакцию проводили с использованием мышиных моноклональных антител к нестину. **Результаты.** После проведения иммуноцитохимической реакции на нестин при первичном осмотре окрашенных срезов определялся четкий линейный иммунопозитивный контур вокруг предполагаемой зоны инфаркта. Детальный анализ этого контура (демаркационной линии) показал, что он четко разделяет интактную и поврежденную ткани и состоит из астроцитов, имеющих многочисленные иммунопозитивные отростки, часть из которых участвует в образовании глиальной периваскулярной пограничной мембраны. **Заключение.** Яркая и контрастная реакция на нестин позволяет легко оценивать объем повреждения на серийных парафиновых срезах ишемизированного головного мозга. Гистохимическую реакцию на нестин можно считать удобным маркером зоны повреждения головного мозга при моделировании ишемического инсульта.

Для цитирования: Колпакова М.Э., Бельдиман Л.Н., Яковлева А.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э., Власов Т.Д. Применение иммуногистохимической реакции на нестин для определения размеров повреждения мозга при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 148-154.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.148-154

Для корреспонденции: Колпакова Мария Эдуардовна, зав. лаб., канд. мед. наук, доцент, лаб. патофизиологии научно-образовательного института Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: patho@yandex.ru

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.09.2018

Kolpakova M.E.¹, Beldiman L.N.¹, Yakovleva A.A.¹, Kirik O.V.², Korzhevsky D.E.², Vlasov T.D.¹

The use of an immunohistochemical reaction for nestin in determining the size of brain injury after transient occlusion of the middle cerebral artery

¹ I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, L'va Tolstogo Str. 6-8, Saint Petersburg 197022;

² Institute of Experimental Medicine, Akademika Pavlova Str. 12, Saint Petersburg 197376

Evaluating the condition of astrocytes is important for assessment of brain injury. **Aim.** To develop a new approach to assessing the size of brain injury following focal transitional ischemia in the middle cerebral artery circulation using an immunocytochemistry reaction for nestin, a protein of intermediate filaments, which is considered a marker of stem cells. **Methods.** Injury of the rat brain was induced by 30-min occlusion of the left middle cerebral artery followed by 48-h reperfusion. A morphological study of endbrain serial frontal paraffin sections was performed. A 0.1% aqueous solution of Nissl cresyl violet (Dr. Grubler, Germany) was used for survey staining. The population of activated glial cells was examined using an immunocytochemical reaction for nestin with mouse monoclonal antibodies to nestin; viability of neurons was evaluated using an immunocytochemical reaction for NeuN. **Results.** The immunocytochemical reaction revealed a clear, linear immunopositive contour around the suggested infarct zone. In

two days after unilateral ischemia, the cresylic violet staining showed that the center of damage was localized in the striatum and/or basolateral area. The light microscopy study of this contour (demarcation line) showed that it divided intact and damaged tissue.

Conclusion. Therefore, nestin is a convenient marker of brain injury in experimental ischemic stroke. The immunocytochemical reaction in combination with quantitative analysis of scanned images is an optimum tool for determining the size of brain injury.

Keywords: ischemia, middle cerebral artery, nestin, striatum.

For citation: Kolpakova M.E., Beldiman L.N., Yakovleva A.A., Kirik O.V., Korzhevsky D.E., Vlasov T.D. The use of a immunohistochemical reaction for nestin in determining the size of brain injury after transient occlusion of the middle cerebral artery. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63 (2): 148-154. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.148-154

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 27.09.2018

Введение

Острая фокальная ишемия головного мозга приводит к развитию патологических процессов, затрагивающих все основные клеточные популяции нервной ткани: нейроны, астроциты, микроглиоциты, эндотелиоциты и другие клетки. Размер очага повреждения или «ядро инсульта» и последующая клеточная реакция на ишемию, определяющая зону «ишемической полутени» или пенумбры, варьируют даже при использовании хорошо отработанных общепринятых моделей ишемического инсульта [1]. К таким моделям относится монофиламентная модель [2] транзиторной фокальной ишемии в области средней мозговой артерии по J. Koizumi.

Наиболее распространенным методом оценки объема некроза головного мозга является метод окраски жизнеспособных тканей 2 %-м раствором трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). Данный способ морфологической оценки инфаркта позволяет визуализировать как некроз, так и жизнеспособную ткань головного мозга в течение первых 48 ч после восстановления кровотока [3]. Однако данный подход, несмотря на его простоту и эффективность, не позволяет проводить дальнейший морфологический и молекулярный анализ мозговых структур. Возможным решением этой проблемы может быть увеличение числа экспериментальных животных, хотя и это не решает проблемы сопоставимости результатов у отдельных животных. Более того в современных условиях проведения эксперимента необходимо учитывать этические нормы проведения экспериментов на лабораторных животных, рекомендующих ограничивать число опытов *in vivo*.

Другими возможными методами оценки области повреждения являются окраска срезов мозга толуидиновым синим или крезильным фиолетовым по Нислю [4], окраска по Массону [5], сравнение площадей сопоставимых участков ипси- и контралатерального

полушарий [6] или измерение содержания внеклеточной ДНК в плазме крови [7]. Однако, все описанные методы позволяют оценить лишь объем некротизированной ткани, не регистрируя клеточные реакции в области пенумбры. В особенности это относится к реакции астроцитов, характеристика состояний которых важна при оценке любого повреждения мозга [8].

Известно, что после ишемического повреждения в астроцитах начинается экспрессия нетипичных для них белков промежуточных филаментов, в частности, нестина, который принято считать маркером нейральных стволовых и прогениторных клеток [9,10]. Экспрессия нестина в мозге интактных взрослых животных регистрируется только в клетках, расположенных в 2 герминативных зонах: субвентрикулярной зоне боковых желудочков [11] и зубчатой извилине гиппокампа [9]. Однако при ишемическом повреждении мозга происходит увеличение числа нестин-иммунопозитивных клеток. Нестин появляется в активированных астроцитах, олигодендроцитах, нейронах и эндотелиоцитах кровеносных капилляров [12–16]. Распределение иммунореактивных астроцитов, как правило, привязано к зонам дегенерации нейральных элементов [15]. Можно полагать, что анализ распределения активированных нестин-иммунопозитивных астроцитов будет способствовать определению границ зоны ишемического повреждения и оценка состояния структур пограничной зоны.

Цель исследования – разработка нового подхода оценки объема повреждения головного мозга при фокальной транзиторной ишемии в бассейне средней мозговой артерии (СМА) с использованием иммуноцитохимической реакции на нестин.

Методика

При проведении экспериментов руководствовались «Правилами проведения работ с использованием

экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г. Работа одобрена этическим комитетом университета. Эксперименты выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar ($n=16$) и линии SHR ($n=11$). Фокальную транзиторную ишемию моделировали под общей анестезией (тиопентал-натрий, 60 мг/кг) при помощи монофиламентной эндovasкулярной окклюзии средней мозговой артерии по J. Koizumi [2]. Продолжительность нарушения кровообращения в бассейне левой средней мозговой артерии в каждом случае составляла 30 мин, время реперфузии 48 ч. Животных выводили из эксперимента передозировкой тиопентала натрия. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [17] и подвергали стандартным гистологическим процедурам. Проводили морфологическое исследование серийных фронтальных срезов конечного мозга, соответствующих уровню стереотаксических координат $0,48 \text{ мм} \pm 0,36 \text{ мм}$ по отношению к брегме согласно анатомического атласу Paxinos Watson [18].

Для обзора использовали окраску парафиновых срезов 0,1% водным раствором крезилового фиолетового (Dr. Grubler, Германия) по Нисслию. Для оценки популяции активированных глиальных клеток использовали иммуноцитохимическую реакцию на нестин [19], для оценки жизнеспособности нейронов — реакцию на NeuN [20]. Иммуногистохимическое окрашивание проводили с использованием мышиных моноклональных антител к нестину (клон Rat-401) в разведении 1:400 (BD Biosciences, США), к NeuN (клон A60) в разведении 1:400 (Merck Millipore, США).

Иммуноцитохимическое выявление нестина. Последовательность процедур:

1. Депарафинированные, промытые в дистиллированной воде срезы подвергали в течение 20 мин процедуре теплового демаскирования в пароварке в сосуде Хелендахеля в модифицированном цитратном буфере pH 6,1 (S1700; Dako, Дания), предварительно прогретом до 60°C .

2. Остывшие предметные стекла промывали дистиллированной водой и помещали в стаканчик с 3%-ным раствором перекиси водорода на 10 мин при комнатной температуре для блокирования эндогенной пероксидазы.

3. Срезы промывали в фосфатном буфере (ФСБ) и проводили блокировку неспецифического связывания антител раствором Protein Blok (Spring Bioscience, США) при комнатной температуре 10 мин.

4. Наносили на срезы необходимое количество мышиных моноклональных антител к нестину (клон Rat-401) в разведении 1:400 (BD Biosciences, США) и помещали стекла во влажную камеру (например, в ква-

дратные чашки Петри $100 \times 100 \text{ мм}$, SARSTEDT 82.9923.422, Австралия), затем инкубировали в термостате при 27°C в течение 20 ч. Смывали антитела с препаратов ФСБ и помещали их в свежую порцию того же буфера на 15 мин.

5. Фильтровальной бумагой удаляли буфер вокруг срезов и наносили на срезы необходимое количество вторичных антител — набор MACH 2 Mouse HRP-polymer (Bioscare medical, США). Покачивали предметное стекло для равномерного распределения антител, помещали препараты во влажные камеры. Инкубировали в термостате при температуре 27°C в течение 20 мин. Смывали антитела ФСБ и помещали стекла в сосуд со свежей порцией того же буфера на 15 мин.

6. Наносили на срезы необходимое количество рабочего раствора 3,3'-диаминобензидин тетрагидродорида (DAB+ (Dako, Дания)). В течение 1-3 мин происходило образование окрашенного продукта гистохимической реакции. Процесс контролировали под микроскопом и останавливали реакцию до появления неспецифического фона.

7. Смывали раствор хромогена и промывали препараты в 2-3 порциях дистиллированной воды (по 3-5 мин в каждой). У части препаратов подкрашивали ядра гематоксилином Джилла в течение 30 с, подсинивали в щелочной воде (1 капля 10% аммиака на 10 мл дистиллированной воды). Проводили стандартные процедуры и заключали срезы в перманентную среду.

Полученные препараты анализировали в световом микроскопе Leica DM750 (Leica, Германия) и фотографировали с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

Количественный анализ проводили на цифровых изображениях малого увеличения, полученных при помощи сканера EPSON Perfection V500 PHOTO. Измерение площади внутри границ нестин-иммунопозитивных структур выполняли с использованием программы ImageJ (NIH, США). Статистическую обработку данных проводили в программе Excel (Microsoft Office 2013).

Результаты и обсуждение

Анализ препаратов, окрашенных крезильным фиолетовым, показал, что через 2 сут после односторонней ишемии очаги повреждения затрагивают только левое полушарие и локализуются в стриатуме и/или базолатеральной области полушария. По степени повреждения были выделены 2 варианта: умеренное локальное повреждение нейронов стриатума без очаговой деструкции нервной ткани и ишемический инфаркт, сопровождающийся очаговой некротической

деструкцией ткани и развитием воспалительной реакции. В обоих случаях четко определить границу повреждения на препаратах при окраске по Нисслю не представлялось возможным.

После проведения иммуноцитохимической реакции на нестин при первичном осмотре окрашенных срезов даже без использования микроскопа определялся четкий линейный иммунопозитивный (ИП) контур вокруг предполагаемой зоны инфаркта. Детальный анализ этого контура (демаркационной линии) показал, что он разделяет интактную и поврежденную ткань. Со стороны повреждения внутри этого контура отсутствуют жизнеспособные нейроны, в ядрах которых не определяется белок NeuN, а эндотелий сосудов проявляет интенсивную реакцию на нестин. В составе демаркационной линии клетки, содержащие нестин, имеют многочисленные отростки, часть из которых участвует в образовании глиальной периваскулярной мембраны (рис. 1, а, б). Со стороны интактной ткани в ядрах нейронов присутствует белок NeuN, эндотелий сосудов проявляет слабую реакцию на нестин.

Полученные препараты были использованы для оценки границ повреждения, проходящих по демаркационной нестин-ИП линии, с помощью сканера. После сканирования препаратов и дальнейшей обработки в программе ImageJ были вычислены площади повреждения и определены анатомические структуры, которые оно затрагивало. Было установлено, что на фронтальных срезах головного мозга на уровне $0,48 \text{ мм} \pm 0,36 \text{ мм}$ от брегмы в случае незначительного локального повреждения ($S=3,39 \pm 0,97 \text{ мм}^2$) указанное по-

ны сенсомоторная кора, бледный шар и базальное ядро Мейнерта (рис. 2, б). В случае развития ишемического инфаркта ($S=21,11 \pm 2,7 \text{ мм}^2$) у большинства животных были поражены стриатум, первичная и вторичная сенсомоторная кора, инсулярная кора, эндопириформная и пириформная кора (рис. 2, в).

Проблема оценки повреждения мозга и определение зоны ишемической полутени на гистологических препаратах представляется достаточно сложной с учетом отсутствия четких маркеров пограничной области, расположенной вокруг поврежденной части мозга. При использовании классической гистологической окраски по методу Ниссля сложно определить границу между поврежденной и интактной тканью. При окраске по Массону, которую используют при оценке объема повреждения мозга [17] нередко получаются вариabельные результаты, которые зависят от особенностей применения методики, а также от выбранного метода фиксации материала. Использование более сложного метода – метода выявления апоптотических клеток («TUNEL») [21] дает возможность видеть отдельные погибающие клетки, но не позволяет определить границу очага повреждения. Использование ранее применявшегося метода оценки жизнеспособности нейронов с помощью иммуноцитохимической реакции на белок ядер нервных клеток NeuN [22] показало, что в случае инфаркта мозга и быстрой гибели нейронов не происходит такого же быстрого разрушения NeuN, как в случае изолированного повреждения нейронов [22], и в очаге повреждения встречаются клетки-тени неправильной формы, сохраняющие иммунореактив-

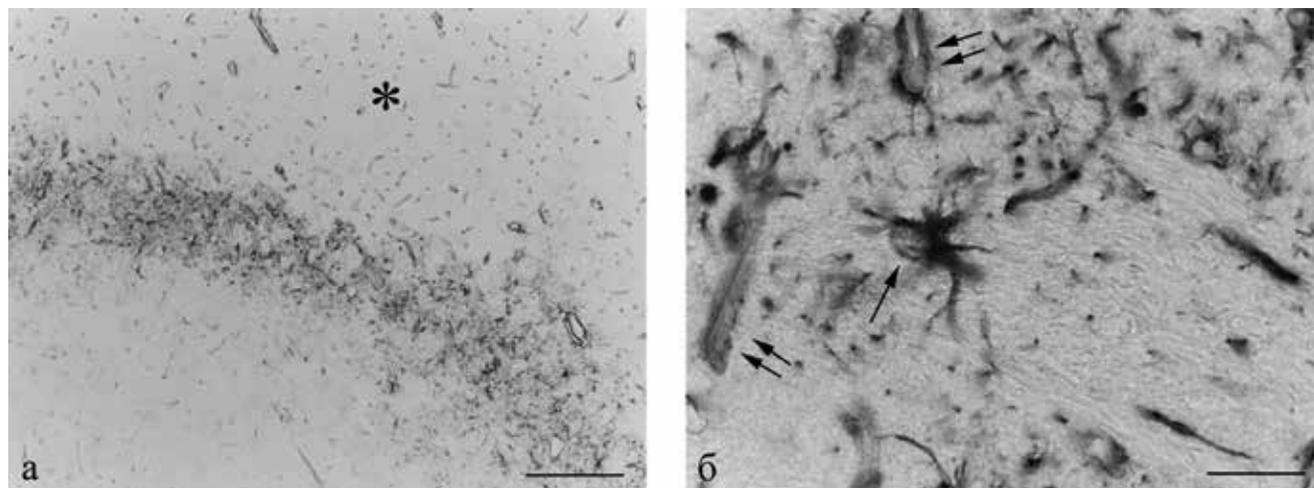


Рис. 1. Демаркационная нестин-ИП линия в стриатуме левого полушария головного мозга.

а – общий вид, звездочкой отмечена сторона повреждения, б – нестин-ИП астроцит (указан стрелкой), ИП-реакция в эндотелии сосудов (указана двойной стрелкой).

Иммуноцитохимическая реакция на нестин.

Масштаб отрезка – 20 мкм (а), 5 мкм (б).

вреждение затрагивало только стриатум (рис. 2, а). В случае значительного локального повреждения ($S=10,22\pm 3,16 \text{ мм}^2$), помимо стриатума были вовлече-

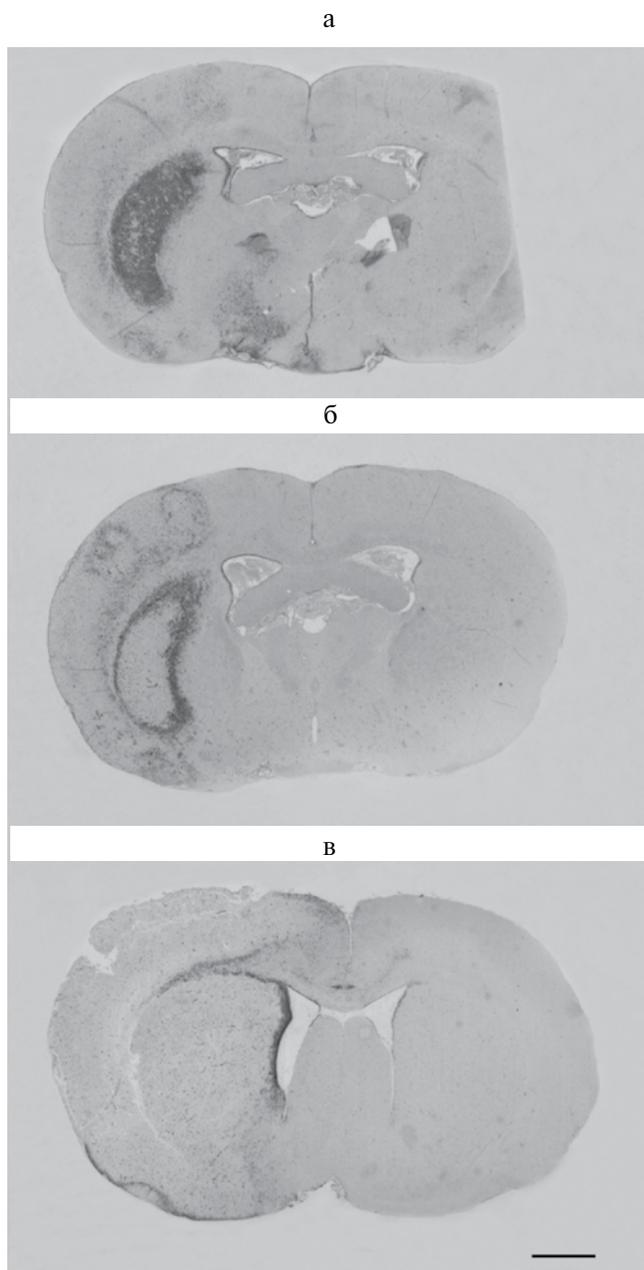


Рис. 2. Фронтальные срезы головного мозга крысы. Различная степень повреждения через 48 ч после 30 мин окклюзии СМА: а – локальное повреждение стриатума без некроза нервной ткани, б – локальное повреждение нейронов стриатума, затрагивающее кору с возможным некрозом/апоптозом в стриатуме, в – ишемический инфаркт левого полушария с сохранением поясной коры, мозолистого тела и СВЗ. Иммуноцитохимическая реакция на нестин. Масштаб отрезка равен 100 мкм.

ность по отношению к NeuN. В сравнении с перечисленными методами, использование реакции на нестин позволяет выявлять именно пограничную зону.

Использование предлагаемого подхода обосновывается тем, что нестин начинает экспрессироваться в астроцитах только при повреждении нервной ткани [23, 24], поэтому можно утверждать, что клетки, отделяющие поврежденную ткань мозга от интактной, являются активированными астроцитами. По данным литературы, экспрессия нестина в астроцитах начинается уже в первые сутки после повреждения и продолжается в течение 1 мес [5]. Именно эти астроциты участвуют в дальнейшем в формировании глиального рубца, который, в свою очередь, участвует в секвестрации очага инфаркта и способствует восстановлению гематоэнцефалического барьера в пограничной зоне.

Яркая и контрастная реакция на нестин позволяет упростить методику получения количественных данных, отказавшись от проведения классической микроскопии, и использовать сканированные изображения, которые удобно загружать в общедоступную программу обработки морфологических данных – ImageJ.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что нестин является надежным маркером зоны повреждения головного мозга при моделировании ишемического инсульта, а применение иммуногистохимической реакции в сочетании с количественным анализом сканированных изображений является удобным инструментом для определения объема повреждения мозга на фиксированных препаратах.

Литература

1. Мясищева О.В., Покровский М.В., Гуреев В.В., Анциферов О.В., Мартынов М.А. Экспериментальные модели ишемического повреждения головного мозга. *Научные ведомости, серия медицина. Фармация*. 2014; 11(182). Выпуск 26/1: 123-6.
2. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke*. 1986; 8: 1-8.
3. Wang J., Gan Y., Han P., Yin J., Liu Q., Ghanian S., Gao F., Gong G., Tang Z. Ischemia-induced Neuronal Cell Death Is Mediated by Chemokine Receptor CX3CR1. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 1-9.
4. Григорян А.С., Гилерович Е.Г., Павличенко Н.Н., Кругляков П.В., Соколова И.Б., Полянцев Д.Г. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на посттравматические процессы при экспериментальной травме головного мозга. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2009; 4(3): 58-67.
5. Krajewski S., Wang J., Khan T., Liu J., Sze Ch.H., Krajewska M. Image Analysis Algorithms for Immunohistochemical Assessment of Cell Death. In: Lossi L, Merighi A., eds. *Neuronal Cell Death Methods Mol Biol*. 2015; 1254: 181-96.

6. Соколова И.Б., Зинькова Н.Н., Билибина А.А., Кругляков П.В., Гилерович Е.Г., Полынцев Д.Г. и др. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2007; 11(4): 54-62.
7. Конорова И.Л., Максимова М.Ю., Смирнова И.Н., Болотова Т.А., Ершова Е.С., Вейко Н.Н. и др. Циркулирующая в плазме крови внеклеточная ДНК в патогенезе ишемического инсульта: роль транскрибируемой области рибосомного повтора. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 2: 13-23.
8. Jiang W., Yu W., Qu Y., Shi Z., Luo B., Zhang J.H. Cerebral Ischemic Reperfusion Injuries (CIRI). *Springer Series in Translational Stroke Research*. 2018: 259.
9. Fukuda S., Kato F., Tozuka Y., Yamaguchi M et al. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*. 2003; 23(28): 9357-66.
10. Lendahl U., Zimmerman L. and McKay R. D. CNS stem Cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990; 60(4): 585-95.
11. Ernst C and Christie B. R. Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat. *Eur. J. Neurosci*. 2005; 22(2): 3059-66.
12. Duggal N., Schmidt-Kastner R., Hakim A.M. Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 1997; 768: 1-9.
13. Li Y. and Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*. 1999; 838: 1-10.
14. Tonchev A.B., Yamashima T., Sawamoto K. and Okano H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res*. 2005; 81(6): 776-88.
15. Korzhevskii D. E., Lentsman M. V., Gilyarov A.V., Kirik O.V., Vlasov T.D. Induction of nestin synthesis in rat brain cells by ischemic damage. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2008; 38 (2): 139-43.
16. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Гиляров А.В. Реверсия эмбрионального фенотипа глиальных клеток под влиянием кратковременной общей ишемии головного мозга. *Морфология*. 2006; 129 (2): 48.
17. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem*. 2015; 59 (3): 233-7.
18. Paxinos G., Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Fourth Edition.* — San Diego: Acad. Press. 1998.
19. Kirik O.V., Vlasov T.D., Korzhevskii D.E. Neural stem cell markers nestin and musashi-1 in rat telencephalon cells after transient focal ischemia. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013; 43(5): 587-91.
20. Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Vlasov T.D. Structural organization of striatal microgliaocytes after transient focal ischemia. *Neuroscience and behavioral physiology*. 2013; 43(4): 457-60.
21. Yang D., Zhao B., Li W., Ouyang Z., Liu Z., Yang H et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Human Molecular Genetics*. 2010; 19 (20): 3983-94.
22. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Байса А.Е., Власов Т.Д. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии. *Бюл. Экспер. Биол. Мед.* 2009; 147(2): 217-9.
23. Коломеец Н.С., Уранова Н.А. Современные представления о реактивности астроцитов при шизофрении. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2014; 114(5-1): 92-9.
24. Sofroniew M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32: 638-47.

References

1. Myasishheva O.V., Pokrovskiy M.V., Gureev V.V., Anciferov O.V., Martynov M.A. Experimental models of ischemic injury of the brain. *Nauchnye ведомosti, seriya meditsina. Farmatsiya*. 2014; 11(182). 26/1: 123-6. (In Russian)
2. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke*. 1986; 8: 1-8.
3. Wang J., Gan Y., Han P., Yin J., Liu Q., Ghanian S., Gao F., Gong G., Tang Z. Ischemia-induced Neuronal Cell Death Is Mediated by Chemokine Receptor CX3CR1. *Sci Rep*. 2018; 8(1):1-9.
4. Grigorian A.S., Gilerovich E.G., Pavlichenlo N.N., Kругляков P.V., Sokolova I.B., D.G.Polyntesev The effects of multipotent mesenchymal stem cells transplantation on post-traumatic processes after the experimental traumatic brain injury. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2009; 4(3): 58-67. (In Russian)
5. Krajewski S., Wang J., Khan T., Liu J., Sze Ch.H., Krajewska M. Image Analysis Algorithms for Immunohistochemical Assessment of Cell Death. In: Lossi L, Merighi A., eds. *Neuronal Cell Death Methods Mol Biol*. 2015; 1254: 181-96.
6. Sokolova I.B., Zin'kova N.N., Bilibina A.A., Kругляков P.V., Gilerovich E.G., Polyncev D.G. et al. Cellular therapy potential in the treatment of ischemic stroke in experiment. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2007; 11(4): 54-62. (In Russian)
7. Konorova I.L., Maksimova M.Yu., Smirnova I.N., Bolotova T.A., Ershova E.S., Veyko N.N. et al. Circulating in blood plasma cell-free DNA in the pathogenesis of ischemic stroke: the role of the transcribed region of ribosomal repeat. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; (2): 13-23. (In Russian)
8. Jiang W., Yu W., Qu Y., Shi Z., Luo B., Zhang J.H. (Editors) Cerebral Ischemic Reperfusion Injuries (CIRI). *Springer Series in Translational Stroke Research*. 2018: 259.
9. Fukuda S., Kato F., Tozuka Y., Yamaguchi M et al. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*. 2003; 23(28): 9357-9366.
10. Lendahl U., Zimmerman L. and McKay R. D. CNS stem Cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990; 60(4): 585-95.
11. Ernst C. and Christie B.R. Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat. *Eur. J. Neurosci*. 2005; 22(2): 3059-66.
12. Duggal N., Schmidt-Kastner R., Hakim A.M. Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 1997; 768: 1-9.
13. Li Y. and Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*. 1999; 838: 1-10.
14. Tonchev A. B., Yamashima T, Sawamoto K. and Okano H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res*. 2005; 81(6): 776-88.
15. Korzhevskii D. E., Lentsman M. V., Gilyarov A.V., Kirik O.V., Vlasov T.D. Induction of nestin synthesis in rat brain cells by ischemic damage. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2008; 38 (2): 139-43.

16. Korzhevskiy D.E., Kirik O.V., Gilyarov A.V. Reversion of the embryonic phenotype of glial cells under the influence of short-term global brain ischemia. *Morfologiya*. 2006; 129(2): 48. (In Russian)
17. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem*. 2015; 59 (3): 233-7.
18. Paxinos G., Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Fourth Edition.* — San Diego: Acad. Press. 1998.
19. Kirik O.V., Vlasov T.D., Korzhevskii D.E. Neural stem cell markers nestin and musashi-1 in rat telencephalon cells after transient focal ischemia. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013; 43(5): 587-91.
20. Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Vlasov T.D. Structural organization of striatal microgliaocytes after transient focal ischemia. *Neuroscience and behavioral physiology*. 2013; 43(4): 457-60.
21. Yang D., Zhao B., Li W., Ouyang Z., Liu Z., Yang H. et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Human Molecular Genetics*. 2010; 19 (20): 3983-94.
22. Korzhevskij D.E., Kirik O.V., Bajsa A.E., Vlasov T.D. Stimulation of unilateral ischemic injury to the striatal neurons inflicted by short-term occlusion of the middle cerebral artery. *Byul. eksper. Biol. Med.* 2009; 147(2): 217-9. (In Russian)
23. Kolomeets N.S., Uranova N.A. Current concepts about astrocyte reactivity in schizophrenia. *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. S.S. Korsakova*. 2014; 114(5-1): 92-9. (In Russian)
24. Sofroniew M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32: 638-47.

Сведения об авторах:

- Власов Тимур Дмитриевич**, доктор мед. наук, директор НОИ Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;
Коржевский Дмитрий Эдуардович, доктор мед. наук, проф. РАН, зав. лаб. функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;
Колпакова Мария Эдуардовна, канд. мед. наук, доцент, зав. лаб. патофизиологии НОИ Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: patho@yandex.ru;
Кирик Ольга Викторовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;
Яковлева Анастасия Александровна, науч. сотр. лаб. патофизиологии НОИ Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;
Бельдидман Людмила Никитична, ст. лаб. лаб. патофизиологии НОИ Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.