

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.831-005.4

Авдеев Д.Б., Степанов С.С., Акулинин В.А., Степанов А.С., Шоронова А.Ю., Самсонов А.А.

Реорганизация астроцитов гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий

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

Цель исследования – изучение астроцитов гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. **Методика.** Используются гистологические (окраска гематоксилином и эозином, по Нисслю), иммуногистохимические (*GFAP*, *MAP-2*, *Ki-67*) методы и морфометрия. На тонких (4 мкм) серийных фронтальных срезах гиппокампа изучены астроциты и нейроны через 6 ч, 1, 3, 7, 14 и 30 сут после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. Контролем служили ложнопериоперированные животные. На каждый срок было использовано по 5 крыс. Для получения дополнительной количественной информации о пространственной организации астроцитарных и нейронных сетей использован фрактальный анализ (ImageJ 1.52; плагин FracLac 2.5). Статистические гипотезы проверяли непараметрическими критериями. **Результаты.** Показано, что после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий отмечалась значительная гетерогенность и гетерохронность изменений астроцитов в разных слоях гиппокампа. Через 1 и 3 сут после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий, в результате очаговой деструкции и фрагментации тонких отростков, фрактальная размерность астроцитарной сети гиппокампа статистически значимо уменьшалась, а лакуарность увеличивалась (сравнение с контролем). Через 3 сут (локально, на фоне активации процессов пролиферации) и через 7, 14, 30 сут (во всех слоях гиппокампа) после окклюзии отмечались признаки реактивного астроглиоза – высокая относительная площадь GFAP-позитивного материала и фрактальная размерность были выше, а лакуарность ниже контроля. Происходило равномерное заполнение фрактального пространства всех слоев гиппокампа отростками астроцитов. **Заключение.** Таким образом, после острой ишемии, вызванной 20-минутной окклюзией общих сонных артерий, получены новые данные о закономерностях качественных и количественных изменений реактивных астроцитов гиппокампа. Эти изменения нами расцениваются как проявление естественной защиты нервной ткани головного мозга в реперфузионном периоде.

Ключевые слова: острая ишемия; гиппокамп; астроциты; нейроны; иммуногистохимия; *GFAP*, *MAP-2*, *Ki-67*; морфометрия; фрактальный анализ; крысы Wistar.

Для цитирования: Авдеев Д.Б., Степанов С.С., Акулинин В.А., Степанов А.С., Шоронова А.Ю., Самсонов А.А. Реорганизация астроцитов гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 13-22.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.13-22

Для корреспонденции: Авдеев Дмитрий Борисович, e-mail: avdeev86@inbox.ru

Финансирование. Данная работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» № 14 от 15.12.2017 г. и внутреннего гранта ФГБОУ ВО «Омского государственного медицинского университета» № 574 от 24.11.2017 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.05.2019

Avdeev D.B., Stepanov S.S., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Shoronova A.Yu., Samsonov A.A.

Astrocytes reorganization in the rat hippocampus following a 20-min occlusion of common carotid arteries

Omsk State Medical University,
Lenina Str. 12, Omsk 644099, Russian Federation

Aim. To study hippocampal astrocytes of Wistar rats following a 20-min occlusion of common carotid arteries (OCCA).

Method. Histological (Nissl hematoxylin and eosin staining), immunohistochemistry (*GFAP*, *MAP-2*, *Ki-67*), and morphometry were used. Astrocytes and neurons were studied in thin (4 μm) serial frontal sections of the hippocampus from control rats (sham-operated animals) and at 6 h, and at one, three, 7, 14, and 30 days ($n = 5$ in each group) of OCCA. Fractal analysis was used to obtain additional quantitative information about spatial organization of astrocyte and neuronal networks (ImageJ 1.52; plugin FracLac 2.5). Statistical hypotheses were tested using nonparametric criteria.

Results and discussion. The study showed significant heterogeneity and heterochronicity of changes in the spatial organization of astrocytes in different layers of the hippocampus after OCCA. The fractal dimension (*FD*) of hippocampal astrocyte network was significantly reduced whereas the lacunarity (*L*) was increased compared to the control on days 1 and 3 following OCCA as

a result of focal destruction and fragmentation of thin processes. Signs of reactive astrogliosis evident as a large relative area of GFAP-positive material, FD greater and L lower than the control were observed on day 3, locally and on the background of activated proliferation, and on days 7, 14, and 30, in all layers of the hippocampus. The fractal space was uniformly filled with astrocyte processes in all hippocampal layers.

Conclusion. The study produced new data on qualitative and quantitative changes in hippocampal reactive astrocytes after acute ischemia induced by 20-min OCCA. We interpret these changes as a reflection of natural defense of the cerebral nervous tissue during reperfusion.

Keywords: acute ischemia; hippocampus; astrocytes; neurons; immunohistochemistry; *GFAP*, *MAP-2*, *Ki-67*; morphometry; fractal analysis; Wistar rats.

For citation: Avdeev D.B., Stepanov S.S., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Shoronova A.Yu., Samsonov A.A. Astrocytes reorganization in the rat hippocampus following a 20-min occlusion of common carotid arteries. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 13-22. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.13-22

For correspondence: Avdeev Dmitry Borisovich, DVM, Senior Lecturer of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University, E-mail: avdeev86@inbox.ru

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

Received 16.05.2019

Введение

Изучению нейроглиальных клеток в головном мозге млекопитающих в норме и при различных патологических состояниях уделяется большое внимание. Астроциты имеют специфическую архитектуру, функции и иммунореактивность, модулируют синаптическую передачу в возбуждающих глутаматергических синапсах, контролируют процесс реорганизации межнейронных отношений [1-7].

Установлено, что при черепно-мозговой травме, ишемии, нейродегенерации изменяется функция и морфология реактивных астроцитов. В остром периоде отмечается отек тела и отростков астроцитов, затем – компенсаторная гиперплазия и гипертрофия с удлинением и утолщением отростков, смещением ядра к периферии, усилением экспрессии глиального фибриллярного белка *GFAP* и индукцией пролиферации. В зависимости от характера патологического воздействия, реакция астроглии может быть очаговой, диффузной или смешанной [7, 8]. В литературе широко обсуждаются морфофункциональные особенности реактивных и атрофических астроцитов. Реактивные изменения астроцитов влияют на состояние и выживаемость нейронов [1, 4]. Однако особенности ремоделирования астроцитов требуют дальнейшего изучения [4].

Ранее нами показано, что после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА) развивались умеренные диффузно-очаговые патологические, адаптивные и репаративные изменения нервной ткани [3, 9]. Однако определение количества, площади, периметра астроцитов, диаметра и длины их отростков не дают необходимой количественной информации об их

пространственной организации, а более сложные методы 3D-реконструкции малодоступны. Для решения проблемы предлагается использование фрактального анализа [8, 10].

Фрактальный анализ предназначен для количественного описания любых сложных фракталоподобных структур, каковыми, в частности, по данным литературы, являются нейроны и глиальные клетки нервной ткани, имеющие древовидную повторяющуюся организацию [8, 10-12]. В процессе фрактального анализа с помощью специальной программы рассчитывается фрактальная размерность (FD) – показатель (коэффициент) заполнения нервной ткани (фрактального пространства) астроцитами или нейронами (фрактальные структуры). Дополнительно рассчитывается лакуарность (L) – показатель неоднородности распределения фрактальных структур. В совокупности эти показатели позволяют оценить сложность пространственной организации фрактальных структур. Данный метод ранее применялся для изучения клеток нервной ткани в норме и после патологического воздействия [8, 11, 12]. Однако астроциты исследовались преимущественно при грубой патологии – после очаговых некротических изменений, когда отмечались выраженные проявления патологического периферического астроглиоза [8].

Цель исследования – изучение астроцитов различных слоев гиппокампа крыс линии Wistar в динамике после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Методика

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» и одобре-

на этическим комитетом университета (протокол № 83 от 14 октября 2016 г.). В качестве экспериментальных животных использовали крыс Wistar массой 180–200 г. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями Международного комитета по работе с лабораторными животными, поддержанными ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

Острую 20-минутную ишемию мозга моделировали путем окклюзии общих сонных артерий (ООСА, двух сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии) на фоне премедикации (сульфат атропина 0,1 мг/кг, подкожно) и общей анестезии (Zoletil 100, 10 мг/кг). Состояние животных в послеоперационном периоде оценивалось в баллах с учетом особенностей исследования физиологии и патофизиологии головного мозга [13].

После ООСА материал для исследования брали через 6ч, 1, 3, 7, 14, 30 сут. Было использовано по 5 животных на каждый срок. Контролем служили 5 ложнопериоперированных крыс. Головной мозг фиксировали перфузией 4% раствора параформа в 0,1 М фосфатном буфере (рН – 7,4) через восходящую часть дуги аорты. Блоки заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®) с помощью автомата для гистологической проводки карусельного типа «STP 120». Серийные фронтальные срезы гиппокампа толщиной 4 мкм готовили из участка мозга на уровне (-)2,40 – (-)4,36 мм от Bregma [14]. Использовали санный микротом HM 450 (Thermo) с электронным контролем толщины среза. Препараты готовили из каждого 10-го серийного среза (по 5 на каждый случай, по 25 – на срок).

Для обзорного гистологического исследования гиппокампа срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ниссля. Астроциты выявляли с помощью иммуногистохимической реакции на глиальный фибриллярный белок (*GFAP*), а нейроны – реакцией на ассоциированный с микротрубочками белок (*MAP-2*). Срезы помещали на полилизиновые стекла. В качестве первичных антител использовали моноклональные мышинные антитела (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Для визуализации *GFAP* астроцитов, *MAP-2* нейронов и ядер пролиферирующих клеток (*Ki-67*) использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). После реакции с первичными антителами срезы последовательно инкубировали с вторичными антителами, затем хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол.

Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (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). Для достижения максимальной контрастности и четкости мелких отростков астроцитов в Photoshop CC проводили коррекцию изображения с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость). Дальнейшее морфометрическое исследование астроцитов проводили на масках 8-битовых черно-белых изображений (объектив ×40) с использованием программы ImageJ 1.52. Фрактальный анализ полученных изображений осуществляли с помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods). В основе метода лежит разделение изображений нейронов или глиальных клеток на квадратные ячейки все меньшего размера с подсчетом числа квадратов, включающих часть анализируемой структуры [12].

Определяли относительную площадь *GFAP*- и *MAP2*-позитивного материала в поле зрения (по 80 полей зрения на каждый срок), фрактальную размерность (*FD* – показатель заполнения пространства фрактальной структурой) и лакуарность (*L* – мера неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой) для нейронов и астроцитов. Уменьшение *FD* свидетельствует об упрощении структуры клеток (например, о разрушении отростков), увеличение – об усложнении структуры (гипертрофия и разветвление отростков). Чем выше *L*, тем больше в поле зрения обнаруживалось асимметричных зон без хромогена (*GFAP* или *MAP-2* негативных структур). Повышение показателя *L* выше контроля, свидетельствовало о мелкоочаговом повреждении цитоскелета нейронов или астроцитов. Снижение показателя *L*, свидетельствовало о гипертрофии и равномерном разветвлении отростков [8].

Проверку статистических гипотез проводили с помощью непараметрических критериев Mann-Whitney U-test (парное сравнение между группами и сроками), Wilcoxon signed-rank test (парного сравнения разных отделов одной и той же группы) и Kruskal-Wallis test (сравнения нескольких сроков). Применение непараметрической статистики было связано с небольшим размером выборок, разным характером распределения в вариационных рядах и неравенством дисперсий при сравнении групп. Характер распределения определяли с помощью критерия χ^2 и Колмогорова-Смирнова. Материал представлен как медиана (*Me*) нижний (*Ql*) и верхний (*Qu*) квартили (StatSoft Statistica 8.0) [15]. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При иммуногистохимическом светооптическом исследовании фронтальных срезов гиппокампа при малом увеличении выявлено неоднородное распределение GFAP-позитивного материала: максимальное в белом ве-



Рис. 1. Фронтальный срез головного мозга на уровне гиппокампа, контроль: послойное распределение хромогена. Белые стрелки – слой тел пирамидных нейронов поля CA1; черные стрелки – слой тел зернистых клеток зубчатой фасции; * – молекулярные слои поля CA1 и зубчатой фасции; BB – белое вещество; ПС – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 4$, шкала – 500 мкм.

шестве, далее – в полиморфном и молекулярном слоях и минимальное – в слой пирамидных нейронов (рис. 1).

GFAP-позитивный материал выявлялся преимущественно в телах и отростках волокнистых (фиброзных) астроцитов, расположенных вокруг нейронов (рис. 2, а-г). Эти астроциты имели древовидную организацию: небольшое тело, длинные слабоветвистые отростки с очень высокой плотностью хромогена (рис. 2, б). В поле CA3 выявлялась светлая зона (*stratum lucidum*), которая состояла из апикальных дендритов пирамидных нейронов и гигантских синаптических терминалей, сформированных аксонами мшистых волокон (рис. 2, в). Вокруг терминалей располагались мелкие отростки астроцитов (рис. 2, г).

Слой тел пирамидных нейронов (рис. 2, б) гиппокампа почти не имел астроцитов, тогда как молекулярный и полиморфный слои содержали мало нейронов (рис. 2, а, в) и много астроцитов (рис. 2, б, г). В *stratum radiatum* CA1 волокнистые астроциты имели характерные вытянутые отростки (рис. 2, б).

В отличие от волокнистых (рис. 3, а) для протоплазматических (рис. 3, б) астроцитов было характерно относительно крупное тело, толстые короткие первичные отростки с неровными контурами, рыхлое заполнение хромогеном. Очень мелкие астроцитарные отростки выглядели как хаотический рисунок с невысокой оптической плотностью хромогена (рис. 3, б).

Плотность глиальной (GFAP) и нейронной (MAP-2) сетей в различных слоях CA1 статистически значительно различались. При этом в нервной ткани в 2–3 раза преобладали структуры нейронов (табл. 1).

По данным фрактального анализа, показатели заполнения нервной ткани астроцитами (фрактальной

Таблица 1

Относительная площадь (%) частиц хромогена при иммуногистохимическом выявлении элементов глиальной (GFAP) и нейронной (MAP-2) сетей различных слоев поля CA1 у животных контрольной группы, Me (Q1-Q3)

Слои гиппокампа	Окраска	
	GFAP (глиальная сеть)	MAP-2 (нейронная сеть)
Молекулярный слой (<i>stratum lacunorum</i>)	18,9 (12,6–21,2) $p=0,04^1$	41,8 (36,5–44,3) $p=0,01^1$ $p=0,001^2$
Молекулярный слой (<i>stratum radiatum</i>)	21,4 (17,5–23,1) $p=0,01^1$	40,9 (33,6–48,9) $p=0,001^1$ $p=0,001^2$
Слой пирамидных нейронов	14,2 (12,1–18,2)	55,9 (48,6–58,1) $p=0,001^2$
Полиморфный слой	25,2 (20,2–31,7) $p=0,001^1$	52,9 (49,5–56,3) $p=0,001^2$

Примечание. ¹ – различия статистически значимы в сравнении со слоем пирамидных нейронов, ² – в сравнении с глиальной сетью (Wilcoxon signed-rank test) при $p < 0,05$.

структурой) в контроле также статистически значимо различались (табл. 2). При этом в молекулярном слое мера лакуарности сети астроцитов была минимальной. Все это свидетельствовало о том, что именно в данном слое гиппокампа локализовалась основная масса отростков астроцитов.

Во всех слоях гиппокампа *FD* для нейронной сети (*MAP-2*) была статистически значимо выше, чем для глиальной сети (*GFAP*). Нейронная сеть имела также низкие значения лакуарности. Это свидетельствовало о более высокой плотности и равномерности рас-

пределения отростков нейронов, в сравнении с астроцитами, и подтверждало данные по относительной площади *GFAP*- и *MAP-2*-позитивных структур (табл. 1, 2). Таким образом, фрактальный анализ позволил дополнительно оценить форму и распределение сложных структур (нейроны, астроциты) в нервной ткани.

После ООСА выявлялись отдельные клетки-тени и большое количество темных несморщенных и пикноморфных нейронов (рис. 4, а). Через 30 сут постишемического периода дефицит нейронов в поле СА1 составил 33,0%, СА3 – 17,4%, СА4 – 5,3%, в зубчатой фас-

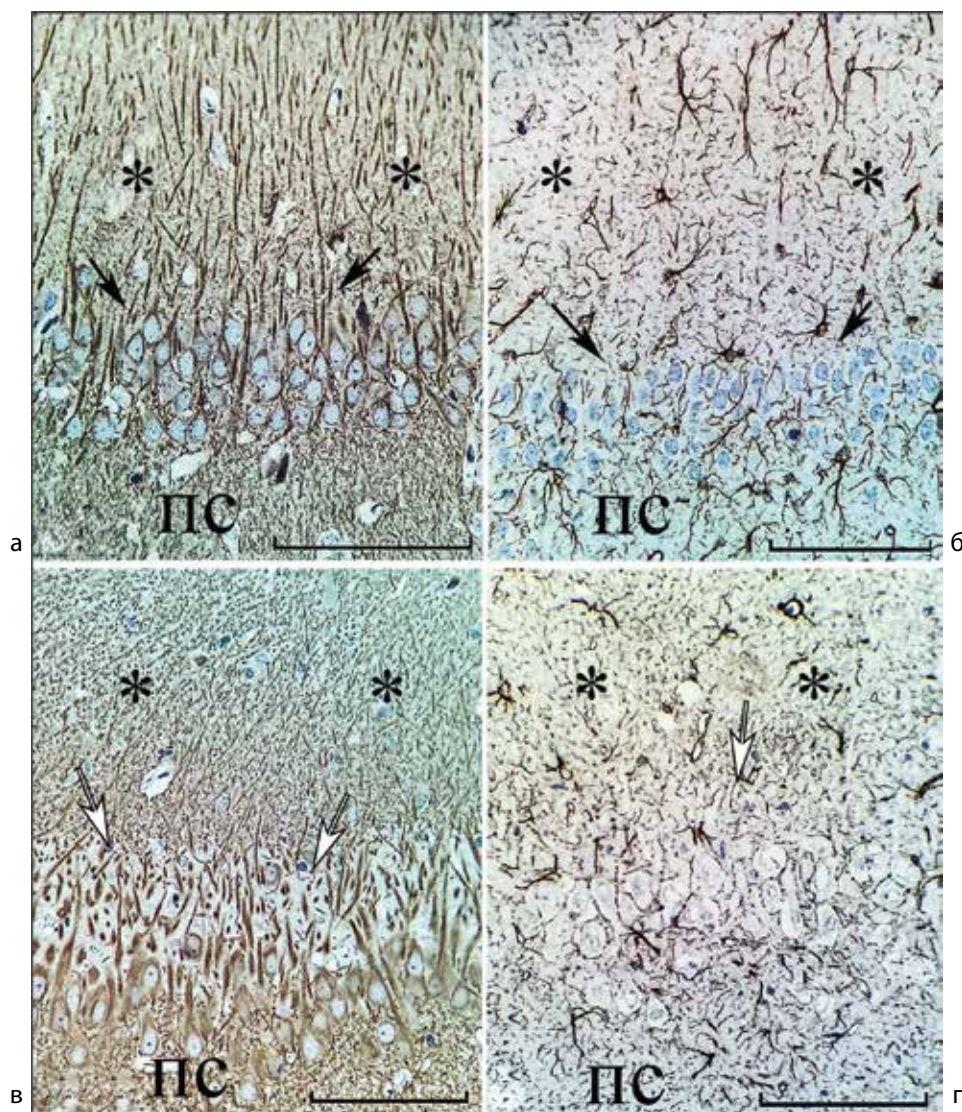


Рис. 2. Поле СА1 (а, б) и СА3 (в, г) гиппокампа в норме: а – слой тел пирамидных нейронов (черные стрелки) и апикальные дендриты *stratum radiatum* молекулярного слоя; б – *GFAP*-позитивный материал в молекулярном слое, слое тел пирамидных нейронов (черные стрелки) и полиморфном слое (ПС); в – слой тел пирамидных нейронов, *stratum lucidum* (белые стрелки) молекулярного слоя; г – *GFAP*-позитивный материал в *stratum lucidum* (белые стрелки), слое тел пирамидных нейронов и ПС. * – молекулярный слой, ПС – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимическая реакция на *MAP-2* (а, в) и *GFAP* (б, г), докраска гематоксилином. Объектив: $\times 40$, шкала – 100 мкм.

ции значимых изменений не выявлено. При этом нейроглиальный индекс в гиппокампе (в целом для всех слоев, окраска по Ниссляу) после ООСА статистически значимо (Kruskal-Wallis test, $p < 0,01$) увеличивался по сравнению с контролем: через 3 сут в 1,8 раза, 7 сут – 2,3 раза, 14 сут – 2,0 раза и через 30 сут – в 1,3 раза. Это происходило за счет уменьшения общей численной плотности нейронов с одной стороны и пролиферации астроцитов с другой стороны. Самая высокая пролиферативная активность астроцитов (*Ki-67*) гиппокампа отмечалась через 3 сут после ООСА. Отростки волокнистых астроцитов гипертрофировались (рис. 4, б), что свидетельствовало о реактивных изменениях [8].

В остром периоде (6 ч, 1 и 3 сут) в результате отека-набухания отмечалась деструкция и фрагментация

тонких отростков. На 7-е сут плотность астроцитарной сети восстанавливалась и даже увеличивалась в молекулярном, полиморфном слоях и внутри слоя пирамидных нейронов. Максимально подобные изменения астроцитов проявлялись через 7 и 14 сут и сохранялись через 30 сут (рис. 5, а, б). При этом отмечалась высокая плотность элементов (*MAP-2*) нейронной сети (рис. 5, в). Все это, по данным литературы, свидетельствовало о проявлениях реактивного астроглиоза на фоне высокой сохранности нейронов [7, 8].

По данным фрактального анализа, в динамике постшемического периода выявлены статистически значимые изменения всех переменных, характеризующих распределение элементов глиальной сети гиппокампа (Kruskal-Wallis test, $p < 0,05$). Через 1 и 3 сут после ОО-

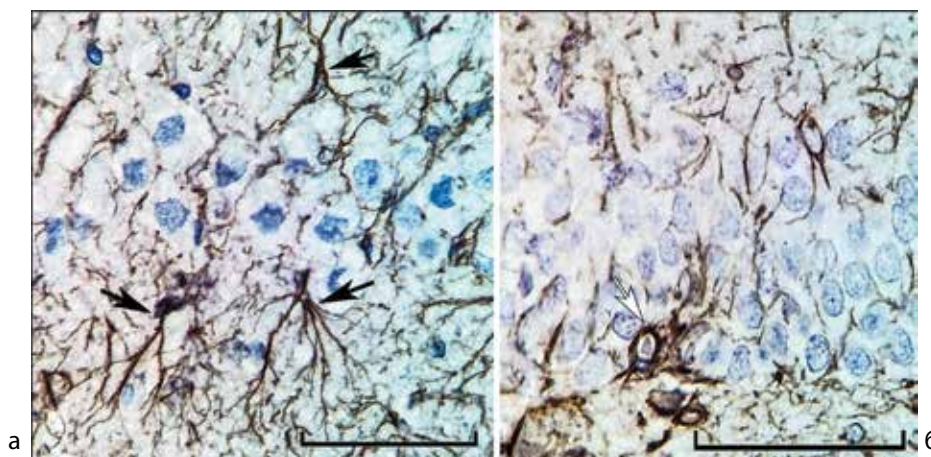


Рис. 3. Поле CA1 (а) и зубчатая фасция (б) гиппокампа в норме. Черные стрелки – волокнистые астроциты в молекулярном и полиморфном слоях поля CA1 (а); белая стрелка – протоплазматический астроцит в слое зернистых клеток зубчатой фасции (б); * – тела нейронов. Окраска: иммуногистохимическая реакция на *GFAP*, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$, шкала – 100 мкм.

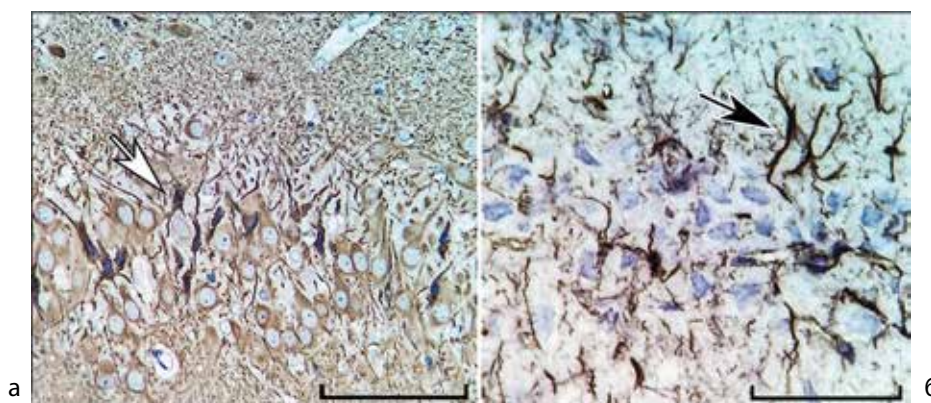


Рис. 4. Поле CA3 гиппокампа через 6 ч (а) и 3 сут. (б) после ООСА: появление большого количества пикноморфных нейронов (а – белая стрелка), гипертрофия отростков волокнистых астроцитов (б – черная стрелка). Окраска: иммуногистохимическая реакция на *MAP-2* (а) и *GFAP* (б), докраска гематоксилином. Объектив: $\times 40$, шкала – 100 мкм (а); $\times 100$, шкала – 50 мкм (б).

CA, в сравнении с контролем, *FD* уменьшалась, а лакунарность отростков астроцитов увеличивалась. Это, вероятно, свидетельствовало об очаговой деструкции и фрагментации части тонких отростков – появлении *GFAP*-негативных зон (табл. 3 и 4).

Через 7 и 14 сут после ООСА (в сравнении с контролем, 1-и и 3-и сут) фрактальная размерность для *GFAP*-позитивного материала статистически значимо увеличивалась во всех слоях гиппокампа, а лакунарность уменьшалась (табл. 3 и 4). Это свидетельствова-

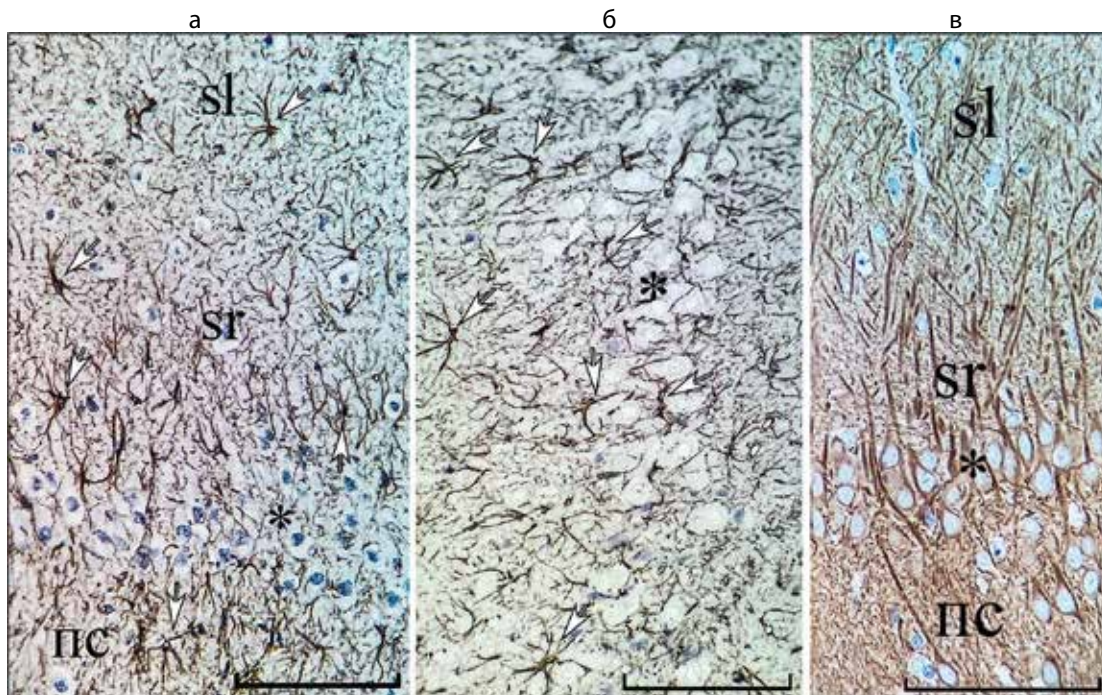


Рис. 5. Поля CA1 (а, в) и CA3 (б) гиппокампа через 14 (а, в) и 30 (б) сут после ООСА: а – высокая плотность распределения разветвленных гиперпролиферированных волокнистых астроцитов (белые стрелки) в *stratum radiatum*, *stratum lacunosum* молекулярного слоя и полиморфном слое; б – волокнистые астроциты (белые стрелки) в слое тел пирамидных нейронов; в – нейроны и их дендриты в поле CA1. * – слои тел пирамидных нейронов, ПС – полиморфный слой, sr – *stratum radiatum*, sl – *stratum lacunosum*. Окраска: иммуногистохимическая реакция на *GFAP* (а, б) и *MAP-2* (в), докраска гематоксилином. Объектив: $\times 40$, шкала – 100 мкм.

Таблица 2

Показатели фрактального анализа элементов глиальной (*GFAP*) и нейронной (*MAP-2*) сетей различных слоев поля CA1 у животных контрольной группы, *Me (Q1-Q3)*

Показатели фрактального анализа	Слои гиппокампа		
	Молекулярный слой	Слой пирамидных нейронов	Полиморфный слой
<i>GFAP</i>			
Фрактальная размерность (<i>FD</i>)	1,65 (1,63–1,72)	1,54 (1,49–1,57) $p=0,01^1$	1,62 (1,58–1,67) $p=0,04^2$
Лакунарность (<i>L</i>)	0,49 (0,42–0,51)	0,60 (0,58–0,72) $p=0,001^1$	0,70 (0,62–0,73) $p=0,01^1$
<i>MAP-2</i>			
Фрактальная размерность (<i>FD</i>)	1,79 (1,74–1,83) $p=0,001^3$	1,78 (1,73–1,81) $p=0,001^3$	1,77 (1,71–1,84) $p=0,001^3$
Лакунарность (<i>L</i>)	0,39 (0,33–0,41) $p=0,01^3$	0,31 (0,29–0,37) $p=0,03^1$ $p=0,001^3$	0,28 (0,25–0,34) $p=0,01^1$ $p=0,001^3$

Примечание. ¹ – различия статистически значимы в сравнении с молекулярным слоем, ² – в сравнении со слоем пирамидных нейронов (Wilcoxon signed-rank test), ³ – между *GFAP* и *MAP-2* (Wilcoxon signed-rank test) при $p < 0,05$.

Таблица 3

Фрактальная размерность глиальной (GFAP) сети различных слоев поля CA1 у животных в контроле и после ООСА, Ме (Q1-Q3)

Группы	Слой гиппокампа		
	<i>Stratum radiatum</i>	Пирамидных нейронов	Полиморфный
Контроль	1,65 (1,63–1,72)	1,54 (1,49–1,57) <i>p</i> =0,01 ¹	1,62 (1,58–1,67) <i>p</i> =0,04 ²
После ООСА, сутки			
1	1,68 (1,61–1,70)	1,12 (0,98–1,23) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ³	1,72 (1,45–1,73) <i>p</i> =0,001 ²
3	1,53 (1,49–1,65) <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,04 ⁴	1,37 (1,25–1,45) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	1,61 (1,52–1,65) <i>p</i> =0,001 ² <i>p</i> =0,02 ⁴
7	1,78 (1,75–1,88) <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	1,55 (1,47–1,59) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ⁴	1,72 (1,71–1,78) <i>p</i> =0,02 ³ <i>p</i> =0,001 ² <i>p</i> =0,01 ⁴
14	1,82 (1,74–1,85) <i>p</i> =0,001 ³	1,66 (1,54–1,69) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,01 ⁴	1,78 (1,72–1,82) <i>p</i> =0,001 ² <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,04 ⁴
30	1,81 (1,71–1,83) <i>p</i> =0,001 ³	1,76 (1,68–1,79) <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,01 ⁴	1,80 (1,65–1,83) <i>p</i> =0,001 ³

Примечание. ¹ – различия статистически значимы в сравнении с молекулярным слоем (*Stratum radiatum*), ² – слоем пирамидных нейронов (Wilcoxon signed-rank test), ³ – контролем, ⁴ – предыдущим сроком (Mann-Whitney U-test) при *p* < 0,05.

Таблица 4

Лакунарность глиальной (GFAP) сети различных слоев поля CA1 у животных в контроле и после ООСА, Ме (Q1-Q3)

Группы	Слой гиппокампа		
	<i>Stratum radiatum</i>	Пирамидных нейронов	Полиморфный
Контроль	0,49 (0,42–0,51)	0,60 (0,58–0,72) <i>p</i> =0,001 ¹	0,70 (0,62–0,73) <i>p</i> =0,01 ¹ ; <i>p</i> =0,001 ²
После ООСА, сутки			
1	0,69 (0,51–0,71) <i>p</i> =0,001 ³	1,32 (1,16–1,35) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ³	0,52 (0,46–0,65) <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,02 ¹ <i>p</i> =0,001 ²
3	0,54 (0,51–0,56) <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,87 (0,68–0,89) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,72 (0,58–0,75) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,01 ² <i>p</i> =0,001 ⁴
7	0,35 (0,29–0,43) <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,50 (0,45–0,59) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,02 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,54 (0,48–0,61) <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,01 ¹ <i>p</i> =0,001 ⁴
14	0,36 (0,31–0,40) <i>p</i> =0,001 ³	0,66 (0,60–0,68) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,01 ⁴	0,52 (0,46–0,55) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,01 ² <i>p</i> =0,001 ³
30	0,32 (0,29–0,38) <i>p</i> =0,001 ³	0,53 (0,51–0,62) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,43 (0,41–0,51) <i>p</i> =0,03 ¹ <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,02 ⁴

Примечание. ¹ – различия статистически значимы в сравнении с молекулярным слоем (*Stratum radiatum*), ² – слоем пирамидных нейронов (Wilcoxon signed-rank test), ³ – контролем, ⁴ – предыдущим сроком (Mann-Whitney U-test) при *p* < 0,05.

ло о равномерном увеличении степени заполнения нервной ткани отростками астроцитов. В пользу последнего свидетельствовали и данные о том, что относительная площадь *GFAP*-позитивного материала в *stratus radiatum* увеличивалась от 21,4% (17,5–23,1%) в контроле до 28,5% (23,1–32,0%) через 14 сут после ООСА ($p = 0,001$). В полиморфном слое – от 25,2% (20,2–31,7%) до 33,4% (28,5–37,9%) ($p = 0,01$; Mann-Whitney U-test).

Таким образом, в остром периоде после ООСА во всех слоях гиппокампа происходила очаговая деструкция отростков астроцитов. Через 7, 14 и 30 сут отмечалась реактивная гиперплазия астроцитарной сети (астроглиоз), которая, вероятно, обеспечивала высокую сохранность нейронной сети (*MAP-2*). Получены данные о гетерогенности и гетерохронности изменений пространственной организации астроцитов различных слоев гиппокампа. Последнее необходимо учитывать при анализе феномена селективности изменений нервной ткани гиппокампа в постишемическом периоде.

Заключение

Таким образом, наряду с определением площади *GFAP*-позитивного материала, фрактальный анализ позволил оценить степень сложности (фрактальная размерность) и равномерности (лакунарность) распределения отростков астроцитов в различных слоях гиппокампа. В остром периоде после ООСА астроцитарная сеть становилась более фрагментарной (неравномерно окрашенной на *GFAP*). Это проявлялось уменьшением фрактальной размерности и значительным увеличением лакунарности. Причиной деструкции отростков астроцитов были отек и набухание с разрушением цитоскелета. Подобные изменения показаны и в исследованиях других авторов [1, 2, 8].

С помощью фрактального анализа выявлена количественная гетерогенность и гетерохронность изменений пространственной организации астроцитарных отростков в молекулярном, полиморфном слоях и слое пирамидных нейронов. Более лабильными и реактивными оказались отростки астроцитов молекулярного слоя. В отдаленном периоде (30 сут) после ООСА выявлялись очаговые скопления волокнистых астроцитов. Это было особенно характерно для *stratum radiatum* молекулярного слоя и полиморфного слоя. В этот период мера структурной сложности глиальных сетей была выше, чем в контроле и раннем постишемическом периоде. Однако в нашем исследовании увеличение количества волокнистых астроцитов не следует рассматривать как патологический астроглиоз, свой-

ственный для ишемического и геморрагического инсульта [7, 8]. Выявленные нами реактивные изменения пространственной организации астроцитов происходили на фоне сохранения структуры нейронных сетей (*MAP-2*). Поэтому полученные данные скорее свидетельствовали об активации естественных защитных функций астроглии, направленных на сохранение и восстановление поврежденных нейронов.

Новые количественные данные об особенностях изменения степени сложности и равномерности распределения отростков астроцитов различных слоев гиппокампа в динамике после 20-минутной ООСА могут быть использованы для оценки значимости особенностей реорганизации нервной ткани гиппокампа и структурных механизмов естественной защиты нейронов за счет реактивного астроглиоза.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Степанов С.С., Авдеев Д.Б.

Сбор и обработка материала – Степанов А.С., Авдеев Д.Б.

Статистическая обработка – Степанов С.С., Акулинин В.А.

Написание текста – Акулинин В.А., Степанов С.С., Редактирование – Шоронова А.Ю., Самсонов А.А.

Литература

1. Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: Potential in Cell Therapy. *Front Mol Neurosci.* 2017 Apr 3; 10(159): 88.
2. Mohn T.C., Koob A.O. Adult astrogenesis and the etiology of cortical neurodegeneration. *J. Exp. Neurosci.* 2015; 9: 25–34.
3. Степанов А.С., Акулинин В.А., Мыщик А.В., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии. *Общая реаниматология.* 2017; 12(4): 6–17.
4. Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A. et al. Astrocytic atrophy following status epilepticus parallels reduced Ca^{2+} activity and impaired synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 26; 11: 215.
5. Luo Y., Xu N. G., Yi W. et al. Study on the correlation between synaptic reconstruction and astrocyte after ischemia and the influence of electroacupuncture on rats. *Chin. J. Integr. Med.* 2011; 17(10): 750–7.
6. Rose C. R., Felix L., Zeug A. et al. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 10(451): 1–20.
7. Ostergaard P.J., Jensen M.B. Histological quantification of astrocytosis after cerebral infarction: A systematic review. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123(7): 439–43.
8. Pirici D., Mogoantă L., Mărgărețescu O., Pirici I., Tudorică V., Coconu M. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2009; 50(3): 381–90.
9. Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Клеточные системы восстановления и утилизации поврежденных нейронов головного мозга белых крыс после 20-минутной ок-

- клюзии общих сонных артерий. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2017; 103(10): 1135–47.
10. Smith T.G. Jr., Lange G.D., Marks W.B. Fractal methods and results in cellular morphology. *J. Neurosci. Methods*. 1996; 69: 1123–6.
 11. Исаева В.В., Пушина Е.В., Каретин Ю.А. Изменения морфометрических показателей и фрактальной размерности нейронов спинного мозга в онтогенезе сими *Oncorhynchus masou*. *Биология моря*. 2006; 32(2): 125–33.
 12. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H.F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7(3): 1–18.
 13. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*. М.; Высшая школа; 1991.
 14. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
 15. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. СПб; Питер; 2003.
 5. Luo Y., Xu N. G., Yi W. et al. Study on the correlation between synaptic reconstruction and astrocyte after ischemia and the influence of electroacupuncture on rats. *Chin. J. Integr. Med.* 2011; 17(10): 750–7.
 6. Rose C.R., Felix L., Zeug A. et al. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 10(451): 1–20.
 7. Ostergaard P.J., Jensen M.B. Histological quantification of astrogliosis after cerebral infarction: A systematic review. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123(7): 439–43.
 8. Pirici D., Mogoantă L., Mărgăritescu O., Pirici I., Tudorică V., Coconu M. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2009; 50(3): 381–90.
 9. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Avdeev D.B. Cellular systems for the recovery and recycling of damaged brain neurons in white rats after a 20-minute occlusion of common carotid arteries. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2017; 103(10): 1135–47. (in Russian)
 10. Smith T.G. Jr., Lange G.D., Marks W.B. Fractal methods and results in cellular morphology. *J. Neurosci. Methods*. 1996; 69: 1123–6.
 11. Isaeva V.V., Pushchina E.V., Karetin Yu.A. Changes in morphometric parameters and fractal dimension of spinal cord neurons in the ontogeny of sims *Oncorhynchus masou*. *Biologiya morya*. 2006; 32(2): 125–33. (in Russian)
 12. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H.F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7(3): 1–18.
 13. Buresh Y., Bureshova O., Kh'yuston D.P. *Methods and basic experiments for the study of brain and behavior. [Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya]*. Moscow; Vysshaya shkola; 1991. (in Russian)
 14. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
 15. Borovikov V. *Statistica. The art of analyzing data on a computer. [Iskusstvo analiza dannykh na komp'yutere]*. St. Petersburg; Piter; 2003. (in Russian)

References

1. Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy. *Front Mol Neurosci.* 2017 Apr 3; 10(159): 88.
2. Mohn T.C., Koob A.O. Adult astrogenesis and the etiology of cortical neurodegeneration. *J. Exp. Neurosci.* 2015; 9: 25–34.
3. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Mytsik A.V., Stepanov S.S., Avdeev D.B. Neuro-glio-vascular complexes of the brain after acute ischemia. *Obshchaya reanimatologiya*. 2017; 12(4): 6–17. (in Russian)
4. Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A., et al. Astrocytic atrophy following status epilepticus parallels reduced Ca²⁺ activity and impaired synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 26; 11: 215.

Сведения об авторах:

Авдеев Дмитрий Борисович, канд. ветеринарных наук, ст. преподаватель каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: avdeev86@inbox.ru;

Степанов Сергей Степанович, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: serg_stepanov@mail.ru;

Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru;

Степанов Александр Сергеевич, очный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: stepan55@yandex.ru;

Шоронова Анастасия Юрьевна, ассистент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: nastasya1994@mail.ru;

Самсонов Артём Андреевич, студент, ОГМУ, e-mail: artem.samsonov93@gmail.com