

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-005.98+611.813+616-005.4-092.9

Макарьева Л.М.¹, Авдеев Д.Б.¹, Акулинин В.А.^{1,2}, Степанов С.С.¹, Коржук М.С.^{1,3}, Шоронова А.Ю.¹

Проявления гипер- и дегидратации нервной ткани полей СА1 и СА3 гиппокампа после непродолжительной окклюзии и пережатия общих сонных артерий

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, 644099, Омск, Россия, ул. Ленина, д. 12;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет» им. П.А. Столыпина, 644008, Омск, Россия, Институтская площадь, д. 1;

³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева, д. 6, литера «В»

Цель работы – изучение структурных изменений нейрон-глиальных взаимоотношений и морфометрическая характеристика процесса отёка-набухания структур полей СА₁ и СА₃ гиппокампа крыс после окклюзии и перевязки общих сонных артерий.

Методика. На белых крысах Wistar моделировали одностороннюю и двустороннюю окклюзию (ООСА) и перевязку (ПОСА) общих сонных артерий. У животных 1-й группы моделировали одностороннюю ООСА (30 мин, $n=30$), у животных 2-й и 3-й групп – двустороннюю ООСА, 20 и 40 мин соответственно ($n=30$ в каждой группе). В 4-й группе применяли ПОСА ($n=30$). Для морфологического исследования использовали гистологические (окраска гематоксилин-эозином и по Нисслю), иммуногистохимические (MAP-2, GFAP) и морфометрические методы исследования. На препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, с помощью плагинов программы ImageJ 1.53 (Find Foci) оценивали различные параметров яркости и распределения пикселей изображения. Реакции на MAP-2 и GFAP использовали для верификации клеток. Проверку статистических гипотез проводили в программе Statistica 8.0 с помощью непараметрических критериев Shapiro-Wilk W-test, Mann-Whitney U-test, Wilcoxon Matched Pairs Test, ANOVA Kruskal-Wallis и ROC анализа.

Результаты. Установлено, что после ООСА и ПОСА в гиппокампе появлялось большое количество гетероморфных ярких зон отёка-набухания с высокой общей интенсивностью пикселей в пике. Максимальное их количество отмечено после ПОСА в течение всего периода наблюдения. После ООСА степень гидратации нейропиля статистически значимо изменялась (группа 2-я – $p=0,03$; группа 3-я – $p=0,0003$), уменьшаясь через 14 и 30 сут наблюдения. У животных 1-й группы преобладали умеренные обратимые проявления отёка-набухания, в группах 2-й, 3-й и 4-й на фоне нормохромных нейронов выявлены различные сочетания набухших, темных сморщенных и несморщенных отростков дендритов/перикарионов, проявления отёка периваскулярных и принейрональных отростков астроцитов. По мере увеличения степени тяжести ишемии выявлялись признаки гипергидратации астроцитарного компартмента и дегидратации нейронов. При этом в 1-й, 2-й и 3-й группах сохранялись функционально значимые возможности восстановления большей части темных нейронов и астроглии. После ПОСА происходил срыв механизмов оттока жидкости по астроцитам, формировались крупные полости со свободной жидкостью и разрушенным GFAP-позитивным цитоскелетом. Это сопровождалось дисфункцией астроцитов и, как следствие, необратимой дегидратацией и прижизненной дегенерацией темных нейронов СА₁ и СА₃ (пикноморфные с гомогенизацией).

Заключение. После ООСА и ПОСА структурно-функциональная реорганизация нейронов полей СА₁ и СА₃ гиппокампа происходила на фоне гипергидратации нейропиля, перинеурональных и периваскулярных пространств (ножки астроцитов). Крайняя степень вариации этих проявлений отмечалась после ПОСА, что свидетельствовало о дисфункции и гибели большого количества астроцитов в результате чрезмерного отёка их отростков вблизи пикноморфных нейронов. При ООСА длительное сохранение признаков отёка-набухания не сопровождалось выраженной необратимой гибелью темных нейронов, большая часть этих нейронов восстанавливалась параллельно с восстановлением астроцитов. Поэтому в этих группах сохранение признаков отёка-набухания целесообразно рассматривать как условие для реализации механизмов саногенеза нервной ткани – её детоксикации.

Ключевые слова: ишемия; СА₁ и СА₃ гиппокампа; тёмные нейроны; отёк-набухание; морфометрия; иммуногистохимия; крысы Wistar

Для цитирования: Макарьева Л.М., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов С.С., Коржук М.С., Шоронова А.Ю., Проявления гипер- и дегидратации нервной ткани полей СА₁ и СА₃ гиппокампа после непродолжительной окклюзии и пережатия общих сонных артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 17–27.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.17-27

Участие авторов: разработка концепции эксперимента — Коржук М.С.; эксперимент, уход за животными, забор материала, приготовление препаратов — Макарьева Л.М.; эксперимент, фотографирование препаратов, создание базы данных — Авдеев Д.Б.; эксперимент, забор материала, написание текста — Акулинин В.А.; морфометрический и информационно-математический анализ, написание текста, иллюстративный материал — Степанова С.С.; эксперимент, уход за животными, забор материала — Шоронова А.Ю. Обсуждение результатов исследования — все соавторы.

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 «Омский государственный медицинский университет» № 574.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.10.2020

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Makarjeva L.M.¹, Avdeev D.B.¹, Akulinin V.A.^{1,2}, Stepanov S.S.¹, Korzhuk M.S.^{1,3}, Shoronova A.Yu.¹

Manifestations of hyper- and dehydration of the nervous tissue of the fields CA1 and CA3 of the hippocampus after variable and permanent occlusions of the common carotid arteries

¹Omsk State Medical University,

Lenina St. 12, Omsk 644099, Russian Federation;

²P.A. Stolypin Omsk State Agrarian University,

Institutskaya Ploshchad 1, Omsk 644008, Russian Federation;

³S.M. Kirov Military Medical Academy,

Academika Lebedeva St. 6, 194044, St. Petersburg, Russian Federation

Aim. To study structural changes in neuron-glial relationships and to provide a morphometric description of swelling of structures in the CA1 and CA3 fields of the rat hippocampus 1, 3, 7, 14, and 30 days after variable (VOCA) and permanent occlusions (POCA) of the common carotid arteries.

Methods. Four groups of sexually mature Wistar rats were studied: group I (30-min unilateral VOCA, $n=30$), group II (20-min bilateral VOCA, $n=30$), group III (40-min bilateral VOCA, $n=30$), Group IV (POCA, $n=30$). Histological (hematoxylin-eosin and Nissl staining), immunohistochemical (MAP-2, GFAP), and morphometric methods were used. On preparations stained with hematoxylin-eosin, using plug-ins of the ImageJ 1.53 (Find Foci) software, various parameters of brightness and distribution of image pixels were evaluated. Reactions for MAP-2 and GFAP were used for cell verification. Statistical hypotheses were tested with Statistica 8.0 software using nonparametric Shapiro-Wilk W test, Mann-Whitney U test, Wilcoxon Matched Pairs test, Kruskal-Wallis ANOVA, and ROC analysis.

Results. After VOCA and POCA, a large number of heteromorphic bright zones of edema swelling appeared in the hippocampus with a high overall pixel intensity at the peak. The maximum number of these zones was noted after POCA during the entire observation period. After VOCA, the degree of neuropil hydration significantly changed (group II, $p=0.03$; group III, $p=0.0003$), decreasing after 14 and 30 days of observation. In group I, moderate reversible swelling prevailed, and in groups II, III, and IV, against the background of normochromic neurons, various combinations of swollen, dark, non-wrinkled, and wrinkled processes of dendrites/perikaryons, and edema of the perivascular and near-neuronal processes of astrocytes were evident. As the severity of ischemia increased, signs of hyperhydration of the astrocytic compartment and dehydration of neurons became evident. In groups I, II, and III, functionally significant possibilities for restoration of most of the dark neurons and astroglia remained. After POCA, the mechanisms of fluid outflow through astrocytes were disrupted. Large cavities with free fluid and a destroyed GFAP-positive cytoskeleton were formed. This was accompanied by dysfunction of astrocytes and, as a result, by irreversible dehydration and intravital degeneration of CA1 and CA3 dark neurons (pycnomorphic with homogenization).

Conclusion. After VOCA and POCA, the structural and functional reorganization of neurons in the CA1 and CA3 fields of the hippocampus was associated with hyperhydration of the neuropil and the perineuronal and perivascular spaces (peduncles of astrocytes). The extreme degree of variation of these manifestations was noted after POCA, which indicated dysfunction and death of a large number of astrocytes as a result of excessive swelling of their processes near pycnomorphic neurons. In the VOCA groups, prolonged swelling was not accompanied by pronounced, irreversible death of dark neurons. Most of these neurons recovered in parallel with the restoration of astrocytes. Therefore, in the VOCA groups, the persistence of swelling should be considered primarily as a condition for engaging the sanogenesis mechanisms in the nervous tissue, i.e., its detoxification.

Keywords: ischemia; CA1 and CA3 of the hippocampus; dark neurons; edema swelling; morphometry; immunohistochemistry; Wistar rats

For citation: Makarjeva L.M., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Korzhuk M.S., Shoronova A.Yu. Manifestations of hyper- and dehydration of the nervous tissue of the fields CA1 and CA3 of the hippocampus after variable and permanent occlusions of the common carotid arteries. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 17–27. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.17-27

Author's contribution: development of the concept of the experiment – Korzhuk M.S.; experiments, animal care, collection of material, making preparations – Makarieva L.M.; experiments, illustrative material, photographing preparations, database creation, discussions – Avdeev D.B.; experiments, material collection, text writing – Akulinin V.A.; morphometric and information and mathematical analysis, text writing – Stepanov S.S.; experiments, animal care, material collection – Shoranova A.Yu. Discussion of research results – all authors.

For correspondence: **Dmitry B. Avdeev**, candidate of veterinary science, senior lecturer of the department of histology, cytology and embryology, «Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Omsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation», e-mail: avdeev86@inbox.ru

Financing. This work was supported by the Innovation Promotion Fund under the program “UMNIK” No. 14 dated December 15, 2017 and an internal grant of The Omsk state medical University № 574.

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

Information about the authors:

Makarieva L.M., <https://orcid.org/0000-0002-1133-6541>

Avdeev D.B., <https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>

Akulinin V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

Stepanov S.S., <https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

Received 12.10.2020

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Введение

Гиппокамп является основной частью архикортекса головного мозга млекопитающих, хорошо изучен и продолжает изучаться в силу особой роли для социальной коммуникации. Важность изучения именно гиппокампа обусловлена его участием в таких ключевых функциях головного мозга как когнитивные, память, эмоции, ориентация в пространстве [1, 2]. Совместно с зубчатой извилиной, субикулумом, пресубикулумом, парасубикулумом и энторинальной корой, (которые представляют парагиппокамповую область) формируется гиппокампальная формация (ГФ) [3–5]. Зубчатая извилина обеспечивает основной вход сенсорной информации от энторинальной коры в гиппокампальную формацию, осуществляя первый этап обработки, и передаёт результат в поле CA_3 , а затем – CA_1 гиппокампа [3].

Отёк-набухание является стандартным ответом нервной ткани головного мозга практически на любое патогенное воздействие, сопровождающееся гипоксией, интоксикацией и нарушением микроциркуляции. Механизмы развития гидропической дистрофии хорошо изучены и продолжают изучаться на молекулярном уровне. Основной причиной нарушения распределения воды в повреждённой нервной ткани являются: энергетический дефицит, дисфункция механизмов ионного гомеостаза, нарушение функции астроцитов и микрососудов [6–10].

Структурные проявления отёка-набухания описаны у экспериментальных животных и человека во всех отделах головного мозга, включая и гиппокамп [11]. При ишемии превалирует цитотоксический отёк-набухание головного мозга [12]. Набухание нейронов со-

провождается увеличением их размеров, растворением нуклеопротеиновых комплексов (хроматофильное вещество Ниссля), гиперхромией и смещением ядра нейрона. Развитие отёка проявляется просветлением цитоплазмы, появлением светлых пространств и вакуолей. При необратимой гидропической дистрофии сохраняются ядра, но полностью разрушаются цитоплазматические органеллы [13].

Однако неизвестно, как на развитие отёка-набухания в гиппокампе влияет продолжительность периода неполной ишемии и при каких гидропических изменениях начинаются нейродегенеративные процессы – патогенетический компонент, а при каких происходит преимущественно защита нервной ткани – саногенетический компонент. Необходимо сравнительное гистологическое и морфометрическое исследование проявлений отёка-набухания половозрелых белых крыс в норме, после окклюзии разной продолжительности (20-, 30-, 40 мин) и перевязки общих сонных артерий. Эти модели неполной ишемии в совокупности позволяют изучать роль градаций её воздействия на ГФ [14]. В настоящем исследовании акцент будет сделан на изучение проявлений отёка-набухания на уровне CA_1 и CA_3 .

Методика

Экспериментальная работа выполнена в ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическим комитетом вуза (протоколы № 83 от 14.10.2016; № 107 от 02.10.2018; № 112 от 26.09.2019; № 123 от 09.10.2020). Для изучения гиппокампа использовали аутобредных половозре-

лых крыс Wistar (самцы масса 250–350 г), которых до и после эксперимента содержали в соответствии со стандартами лабораторных условий. Моделирование острой ишемии осуществляли руководствуясь «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77 № 755) и рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

Выбор моделей был основан на подборе неравноценных по продолжительности и тяжести процесса неполной ишемии головного мозга. Использовали одно-, двустороннюю окклюзию (ООСА) и перевязку (ПОСА) общих сонных артерий. ООСА проводили в течение 30 мин (группа I, $n=30$, односторонняя), 20 мин (группа II, $n=30$, двусторонняя) и 40 мин (группа III, $n=30$, двусторонняя). Группу IV составили животные после ПОСА ($n=30$, двусторонняя). Таким образом, все животные распределились по мере возрастания тяжести ишемии, что позволило провести оценку влияния роли продолжительности неполной ишемии на ее исход. Контролем служили интактные животные без манипуляций на общих сонных артериях ($n=6$). Для анестезии использовали препарат Zoletil 100 (10 мг/кг), содержащий в качестве действующих веществ тилетамин гидрохлорид и золазепам гидрохлорид. Забор материала проводили также под наркозом. Через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после окклюзии и перевязки артерий. Головной мозг крыс ($n=6$, на срок в каждой группе) фиксировали путём последовательной перфузии (100–125 мл раствора 0,9% NaCl + 5000 единиц фрагмина) и 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Черепную коробку вскрывали через 1,5–2 ч, извлекали головной мозг и переносили его в аналогичный охлажденный фиксатор (холодильник, +4 °C). С помощью автомата «STP 120» полученный материал заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы (толщина 4 мкм) готовили на микротоме HM 450 (Thermo), на уровне от (-) 2,40 до (-) 3,36 мм от Bregma (расположение основных структур гиппокампа) [15].

Изучали поля CA₁ и CA₃ гиппокампа. На препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, по Нисслию, при иммуногистохимическом выявлении специфических белков MAP-2 и GFAP проводили идентификацию нейронов и астроцитов. Общую оценку пирамидных нейронов, а также их тинкториальные изменения

проводили на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином и Нисслию, цитоскелета – в реакции на MAP-2 и GFAP.

MAP-2 (ab32454) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (Abcam, США); GFAP (PA0026) – мышинные моноклональные антитела, клон GA5 (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). После реакции с первичными антителами срезы инкубировали с вторичными антителами, для их визуализации использовали мультимерный набор Novolink™ (хромоген DAB – 3,3'-диаминобензидин; Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (масляная иммерсия, объектив ×100), цифровые изображения – на камере 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). Далее использовали стандартные настройки (баланса белого, яркости, контраста при разрешении 600 пикс/дюйм). Для оценки степени гидратации нервной ткани гиппокампа изучали срезы, окрашенные гематоксилин-эозином. На каждый срок отбирали по 30 случайно выбранных полей зрения. На этих полях зрения выделяли области интереса (ROI) – участки нейропиля размером (20×20 мкм), формировали стеки (100 ROI), рассчитывали среднее значение для каждого животного и срока. Далее сравнивали вариационные ряды ($n=20–30$ значений на срок). Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.53c. На гистограммах черно-белых изображений (32 бит; 600 пикселей/дюйм) оценивали распределение пикселей по степени их яркости. Выявляли яркие зоны нейропиля, соответствующие максимальной гидратации. Применяли плагин «Morphological Filters» из пакета «MorphoLibJ» и плагин «Find Foci» (набор программ *GDSC ImageJ* для анализа микроскопических изображений) [<https://imagej.nih.gov/ij/>]. Плагин «Find Foci» позволил разделить каждую ROI на пики, отличающиеся по размерам и степени яркости, дать им количественную оценку. Для этого использовали интегральный показатель «общая интенсивность пикселей в пике» – произведение размера пика в пикселях на среднюю яркость пикселей в пике [16].

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями (Shapiro-Wilk W-test, Mann-Whitney U-test, Wilcoxon Matched Pairs Test, ANOVA Kraskel-Wallis) и ROC-анализа с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft). Количественные данные в исследовании представлены как медиана

(Me – 50% квартиль, Q2) и интерквартильный разброс (Q1-Q3 – 25–75% квартили), процентная доля (%) самых ярких пиков (зоны отёка-набухания). Учитывались выбросы и экстремальные значения (Min-Max). Проблема множественного сравнения решалась путём использования ANOVA Kraskel-Wallis [17].

Результаты и обсуждение

В полях CA₁ и CA₃ гиппокампа животных контрольной и экспериментальных групп выявили сложную структурную композицию взаимосвязанных пирамидных нейронов и астроцитов (рис. 1). Наиболее тесный физический контакт отмечался между отростками нейронов и астроцитов в нейропиле молекулярного и полиморфного слоёв гиппокампа (рис. 1, а, б). Цитоархитектоника CA₁ и CA₃ имеет свои особенности, обусловленные размерами и плотностью укомплектования перикарионов, организацией дендритных деревьев. При реакции на MAP-2 в молекулярном слое поля CA₃ отчётливо верифицировался *stratum lucidum* (рис. 1, б; 4 б), образованный апикальными дендритами пирамидных нейронов и гигантскими терминалями мшистых волокон из зубчатой извилины. Для поля CA₁ характерен выраженный *stratum radiatum*, представленный прямыми дендритами пирамидных нейронов. Менее всего между CA₁ и CA₃ различался *stratum lacunosum moleculare* и полиморфный слой (рис. 1, а). Отростки астроцитов этих полей располагались между отростками нейронов в нейропиле, вокруг перикарионов пирамидных нейронов и микрососудов (рис. 1, в, г).

Таким образом, отмечена изначальная структурная гетероморфность полей CA₁ и CA₃. Наиболее схожими были *stratum lacunosum moleculare* и полиморфный слой. Качественная оценка состояния нервной ткани гиппокампа показала появление после ООСА и ПОСА типичных ишемических изменений всех типов клеток, которые хорошо описаны в литературе [14, 17]. На срезах гиппокампа у контрольных животных встречались единичные тёмные сморщенные клетки (в 2–3 полях зрения из 30), немногочисленные проявления перичеселлюлярного (ПЦО) и периваскулярного (ПВО) отёка. Подобная морфологическая картина была характерна также для группы I и II. Однако, даже после односторонней ООСА ишемические изменения затрагивали существенно больше полей зрения (6–15 полей зрения из 30), чем в контроле, появлялись явные признаки диффузно-очаговой де- и гипергидратации, а также реакции нейроглиальных клеток. При этом, как и в контроле, в общей массе преобладали нормохромные и несморщенные тёмные нейроны (рис. 2, а, б).

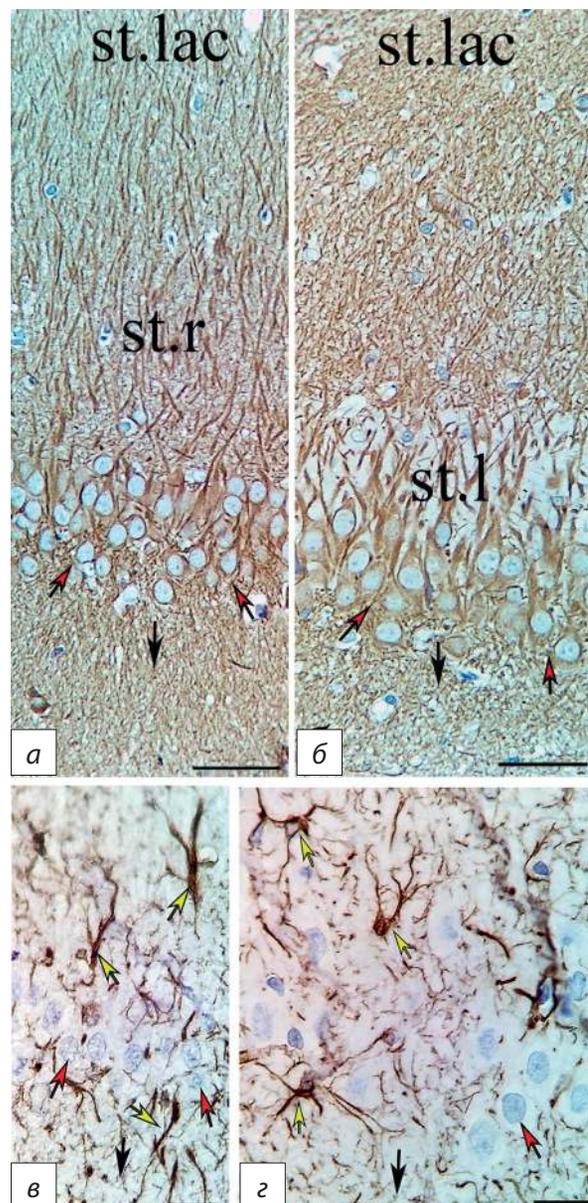


Рис. 1. Фрагменты полей CA₁ (а, в) и CA₃ (б, г) гиппокампа животных контрольной группы: нормохромные пирамидные нейроны (красные стрелки) с равномерным плотным заполнением перикариона и дендритов MAP-2, астроциты (жёлтые стрелки) верифицируются как GFAP-позитивные клетки с отростками (в виде доменов). Черные стрелки – указывают расположение полиморфного слоя, st.r – *stratum radiatum* CA₁, st.l – *stratum lucidum* CA₃, st.lac – *stratum lacunosum moleculare*. Иммуногистохимическая реакция на MAP-2 (а, б) и GFAP (в, г), дополнительная окраска гематоксилином. Объектив: $\times 40$ (а, б) и $\times 100$ (в, г), шкала: 50 мкм (а, б) и 20 мкм (в, г).

Fig. 1. Fragments of fields CA₁ (a, в) and CA₃ (б, г) of the hippocampus of rats of the control group. Normochromic pyramidal neurons (red arrows) with uniform dense filling of the perikaryon and MAP-2 dendrites. Astrocytes (yellow arrows) verified as GFAP-positive cells with processes in the form of domains; black arrows, location of the polymorphic layer; st.r – *stratum radiatum* CA₁; st.l – *stratum lucidum* CA₃; st.lac – *stratum lacunosum moleculare*. Immunohistochemical reaction for MAP-2 (a, б) and GFAP (в, г), additional staining with hematoxylin. Objective: $\times 40$ (a, б) and $\times 100$ (в, г). Scale: 50 μm (a, б) and 20 μm (в, г).

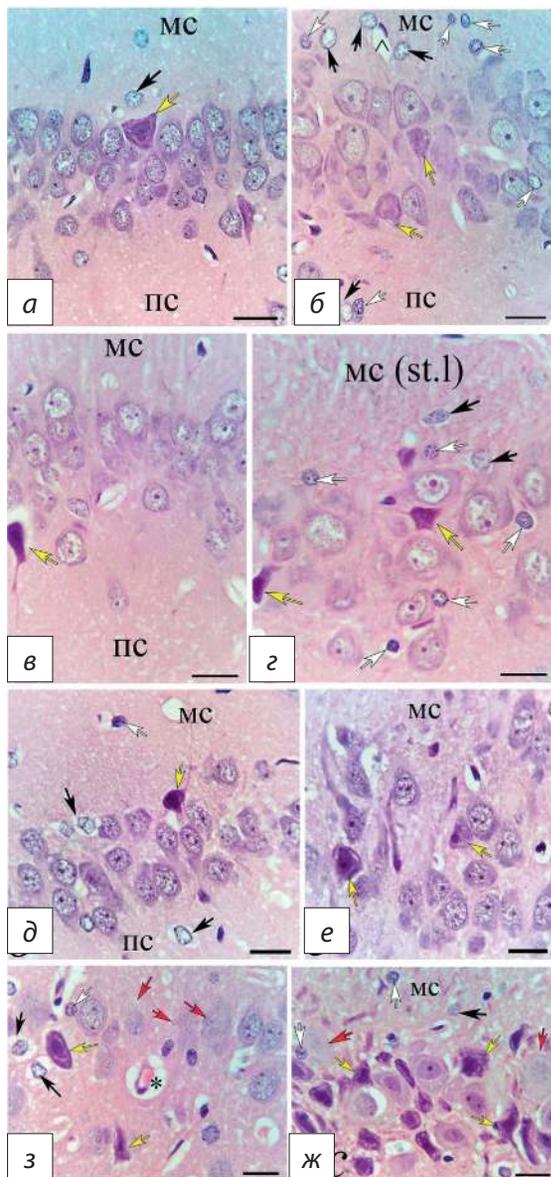


Рис. 2. Фрагменты полей CA₁ (а, в, д, з) и CA₃ (б, з, е, ж) гиппокампа животных группы 1-й (а, б), 2-й (в, з), 3-й (д, е) и 4-й (з, ж) через 1 сут после ООСА (а-е) и ПОСА (з-ж): в группах I-III преобладание нормохромных нейронов, единичные тёмные нейроны, незначительные проявления отёка-набухания; в группе IV (ж) много тёмных нейронов (жёлтые стрелки), появляются гипохромные нейроны (красные стрелки) с признаками гомогенизации, выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлюлярного отёка, чёрные стрелки – астроциты, белые стрелки – олигодендроциты с признаками отёка-набухания. Окраска гематоксилин-эозином. Объектив: ×100, шкала: 20 мкм.

Fig. 2. Fragments of fields CA₁ (a, в, д, з) and CA₃ (б, з, е, ж) of the hippocampus of animals of groups I (a, б), II (в, з), III (д, е), and IV (з, ж) 1 day after OSA (a-e) and POCA (з-ж): in groups I-III, the predominance of normochromic neurons, single dark neurons, slight manifestations of edema-swelling; in group IV there are many dark neurons (yellow arrows), hypochromic neurons (red arrows) appear with signs of homogenization, pronounced manifestations of edema-swelling of the perikaryon and pericellular edema, black arrows are astrocytes, white arrows are oligodendrocytes with signs of edema-swelling. Hematoxylin-eosin staining. Objective: ×100, scale: 20 micron.

При моделировании более тяжёлой ишемии (группы III и IV) уже через 1 сут реактивные и дегенеративные изменения затрагивали половину полей зрения (15–20 из 30). Особенно это было характерно для животных группы IV. Через 1 сут после ПОСА в полях CA₁ и CA₃ кроме скоплений различных тёмных нейронов выявляли гипохромные нейроны с признаками гомогенизации, выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлюлярного отёка (рис. 2, з, ж). Вероятно, это свидетельствовало о необратимых некротических изменениях нейронов [13].

В группе IV (более тяжёлая ишемия) даже через 30 сут сохранялись гипохромные нейроны с признаками гомогенизации, выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлюлярного отёка (рис. 3, в, з).

Через 3 сут в группах II, III и IV отмечено преобладание дегенеративно изменённых нейронов, много тёмных нейронов отмечалось через 7 и 14 сут на фоне высокой сохранности систем межнейронной коммуникации и цитоскелета соседних нейронов (рис. 4).

С помощью плагина Find Foci установлено, что в постишемическом периоде процессы де- и гипергидратации нервной ткани отражались на гистограммах изображений сдвигом среднего значения яркости пикселей в двух противоположных направлениях: для фона – уменьшением значений (потемнение – дегидратация), для зон отёка-набухания – увеличением яркости (просветление – гипергидратация – отёк-набухание) (рис. 5).

По данным ROC анализа, на основании определения AUC (93% ДИ: 0,87–0,96; $p=0,001$) и порога отсечения (яркость 220 и 226), легко верифицировать структуры нейропиля 1) без признаков набухания, 2) с признаками набухания и 3) отёка-набухания. При этом чувствительность метода составила 83,2–90,0 (95% ДИ). Установлено, что в нейропиле CA₁ и CA₃ гиппокампа пики изображения (32-бит) с максимумом яркости <200 соответствовали фону, 200–210 не имели признаков набухания, 211–225 – соответствовали проявлениям набухания (просветление дендритов, терминалей синапсов, мелких отростков астроцитов), >226 – проявлениям отёка (периваскулярные, перичеселлюлярные, крупные отростки и тела отёчных астроцитов).

Морфометрический анализ нейропиля гиппокампа с помощью плагина Find Foci показал, что через 1 сут после ООСА и ПОСА происходило перераспределение пиков изображения нейропиля по интегральному показателю – общей интенсивности пикселей (рис. 6). На рисунке показаны первые 4 наиболее ярких пика (яркость 1 – 2 – 3 – 4 по убыванию) из 20 исследованных в каждой группе. Максимально яркие пики (яр-

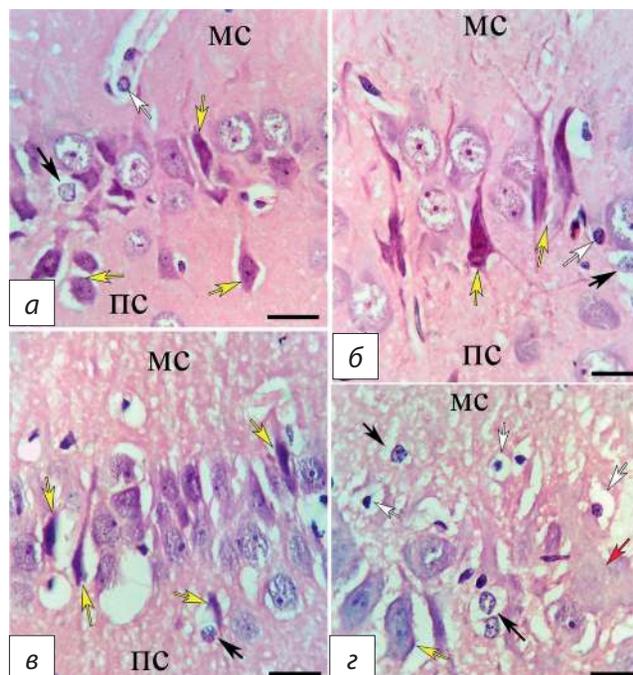


Рис. 3. Фрагменты полей CA_1 (а, в) и CA_3 (б, з) гиппокампа животных группы II (а, б) и IV (в, з) через 3 (а, б) и 30 (в, з) сут после ООСА (а-б) и ПОСА (в-з): преобладание дегенеративно изменённых нейронов, много темных нейронов (жёлтые стрелки), сохраняются гипохромные нейроны с признаками гомогенизации (красные стрелки), выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлярного отёка, черные стрелки – астроциты, белые стрелки – олигодендроциты с признаками отёка-набухания. Окраска гематоксилин-эозином. Объектив: $\times 100$, шкала: 20 мкм.

Fig. 3. Fragments of fields CA_1 (a, v) and CA_3 (б, з) of the hippocampus of animals of groups II (a, б) and IV (в, з) 3 (a, б) and 30 (в, з) days after OSA (a-б) and POCA (в, з): the predominance of degeneratively altered neurons, many dark neurons (yellow arrows), hypochromic neurons with signs of homogenization persist (red arrows), pronounced manifestations of edema-swelling of the perikaryon and pericellular edema, black arrows – astrocytes, white arrows – oligodendrocytes with signs of edema-swelling. Hematoxylin-eosin staining. Objective: $\times 100$, scale: 20 micron.

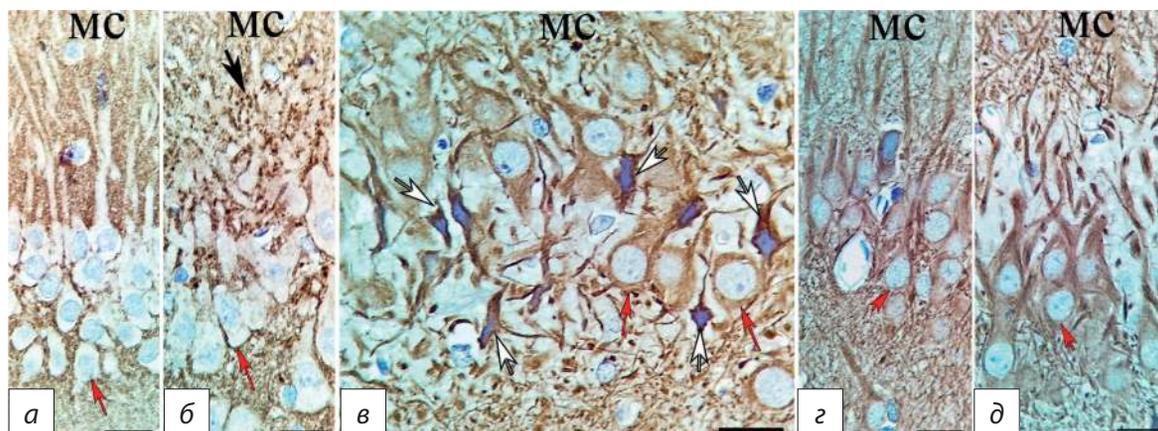


Рис. 4. Фрагменты полей CA_1 (а, з) и CA_3 (б, в, д) гиппокампа животных группы II через 7 сут после ООСА: высокая плотность меток (синаптофизин) синаптических терминалей в *stratum lucidum* CA_3 (б, чёрная стрелка), очаг сморщенных темных нейронов с дегидратированной цитоплазмой (белые стрелки) и периваскулярным отёком. МС – молекулярный слой, красные стрелки – тела пирамидных нейронов. Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин (а, б) и MAP-2 (в, з, д), дополнительная окраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$, шкала: 20 мкм.

Fig. 4. Fragments of fields CA_1 (a, z) and CA_3 (б, в, д) of the hippocampus of animals of group II 7 days after OSA: high density of marks (synaptophysin) of synaptic terminals in the *stratum lucidum* CA_3 (б, black arrow), focus of shriveled dark neurons with dehydrated cytoplasm (white arrows) and perivascular edema. MS, molecular layer; red arrows, bodies of pyramidal neurons. Immunohistochemical reaction for synaptophysin (a, б) and MAP-2 (в, з, д), additional staining with hematoxylin. Objective: $\times 100$, scale: 20 micron.

кость 1 и 2) отмечены в группе IV. Для этой группы характерно наличие значительного разброса показателя для всех степеней яркости. В группе I со слабой ишемией очень ярких пиков, соответствующих отеку-набуханию не выявлено.

Таким образом, через 1 сут после односторонней ОО-СА мы не выявили признаков отёка-набухания, однако статистически значимое снижение общей интенсивности пикселей для менее ярких пиков свидетельствовало о начальных признаках перераспределения связанной жидкости в дендритах. Дегидратация нейронов и их отростков, вероятно, приводила к появлению темных нейронов без сморщивания. То есть, после лёгкой ишемии, даже, если и перераспределение жидкости происходило, его трудно было зарегистрировать с помощью использованного метода анализа гистограмм изображения нейропиля. Во всех других группах содержание ярких пикселей (порог отсека более 211) статистически значимо увеличивалось (рис. 6). Мы полагаем, что это было связано

с выраженным набуханием (яркость 211–225) и даже отёком нейропиля (> 226). При этом появлялись пики, в которых максимальные значения яркости отдельных пикселей достигали 240–255. Тем не менее, показатель общей интенсивности пикселей в пиках в большей степени зависел от размера пика и в меньшей степени – от средней яркости пикселей. Между размером пиков и средней яркостью его пикселей выявлены слабые положительные связи ($r=0,35-0,45$; корреляционный анализ по Спирмену). То есть, проявления отёка-набухания после ОО-СА и ПОСА зависели в основном не от степени гидратации, а от объёма связанных с ним структур нейропиля (дендриты, синапсы, астроциты).

Оценка общей интенсивности пикселей в наиболее ярких пиках (1 – 2 – 3 – 4) показала, что для морфометрической характеристики проявлений отёка-набухания достаточно данных о динамике самых ярких пиков (1). Ниже на графиках представлен сравнительный анализ изменения общей интенсивности пикселей имен-

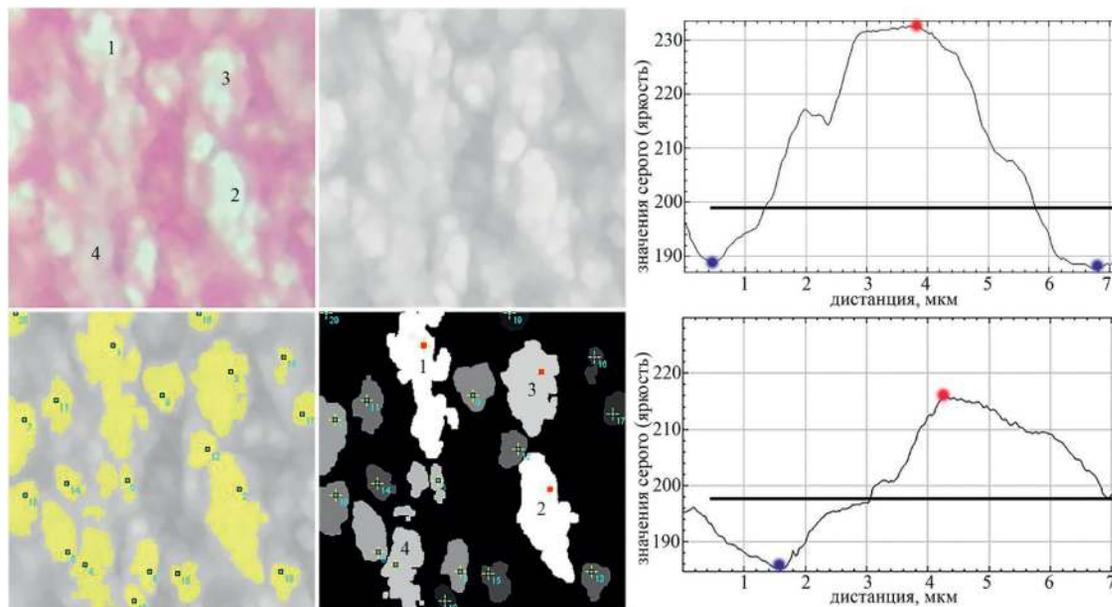


Рис. 5. Последовательные этапы анализа изображения ROI (90000 пикс; 20x20 мкм) нейропиля (исходное, 32-бит, все пики, пики по оттенкам серого), содержащего участок молекулярного слоя поля CA₁ крысы из группы IV (рис. 2, в), через 30 сут. Красные квадраты – максимально яркие пиксели 3- из 20 пиков с наибольшей общей интенсивностью. Гистограммы отражают распределение пикселей пика «1» (яркого) и «4» (бледного: линии (яркость около 200) отсекают пиксели фона (ниже) и зон просветления (выше) нейропиля. Красные точки – максимально яркие (235) пиксели зон отёка набухания, синие – минимальные значения (180) яркости пикселей фона. Окраска гематоксилин-эозином, объектив ×100. Трансформирование и анализ пиков ROI с помощью плагина Find Foci.

Fig. 5. Sequential stages of analysis of the ROI image (90 000 pixels; 20x20 micron) of a neuropil (initial, 32-bit, all peaks, peaks in grayscale), containing a section of the molecular layer of the CA₁ field of a rat from group IV (Fig. 2, c), through 30 days. Red squares are the brightest pixels of 3 out of 20 peaks with the highest overall intensity. Histograms reflect the distribution of pixels of peak “1” (bright) and “4” (pale): lines (brightness of about 200) cut off the background pixels (below) and areas of enlightenment (above) of the neuropil. Red dots are the brightest (235) pixels of swelling edema zones, blue – minimum brightness values (180) of background pixels. Hematoxylin-eosin staining, ×100 lens. Transformation and analysis of ROI peaks using the Find Foci plug-in.

но таких пиков (рис. 7). Установлено, что после ООСА и ПОСА распределение статистически значимо скошено вправо в сторону образования крупных ярких пиков. Максимальное их количество отмечено после ПОСА. При этом ПОСА приводила к стабильно высокому проявлению гипергидратации ($N=7,4; p=0,1$) в течение всего периода наблюдения, а после ООСА степень гидратации нейропиля статистически значимо изменялась (группа II – $p=0,03$; группа III – $p=0,0003$) (рис. 7).

У животных группы I преобладали умеренные обратимые проявления отёка-набухания, а в группах II, III и IV после острой ишемии на фоне нормохромных нейронов выявлены различные комбинации сочетания набухших, темных несморщенных и сморщенных (штопорообразных) отростков дендритов/перикарионов, проявления отёка периваскулярных и принейрональных отростков астроцитов (рис. 8).

Проведённые сравнения, анализ и синтез полученного материала позволили сделать некоторые обобщения,

касающиеся закономерностей де- и гипергидратации гиппокампа после непродолжительной ООСА и ПОСА. Показанные на рисунке 8 переходы от незначительных изменений нейронов по типу набухания (через 1 сут после односторонней ООСА) до выраженных проявлений отёка-набухания (через 30 сут после ПОСА) можно трактовать как последовательный, до определённого момента сбалансированный, процесс обмена жидкости между основными её компартаментами. После односторонней ООСА отмечалась в основном гипергидратация нейронального компартамента (рис. 8, а). По мере увеличения степени тяжести ишемии выявлялись признаки гипергидратации астроцитарного компартамента и дегидратации нейронов (рис. 8, б, в). При этом в группах I, II и III, вероятно, сохранялись потенциальные возможности структурно-функционального восстановления большей части темных нейронов и астроглии. После ПОСА происходил срыв механизмов оттока жидкости по астроцитам,

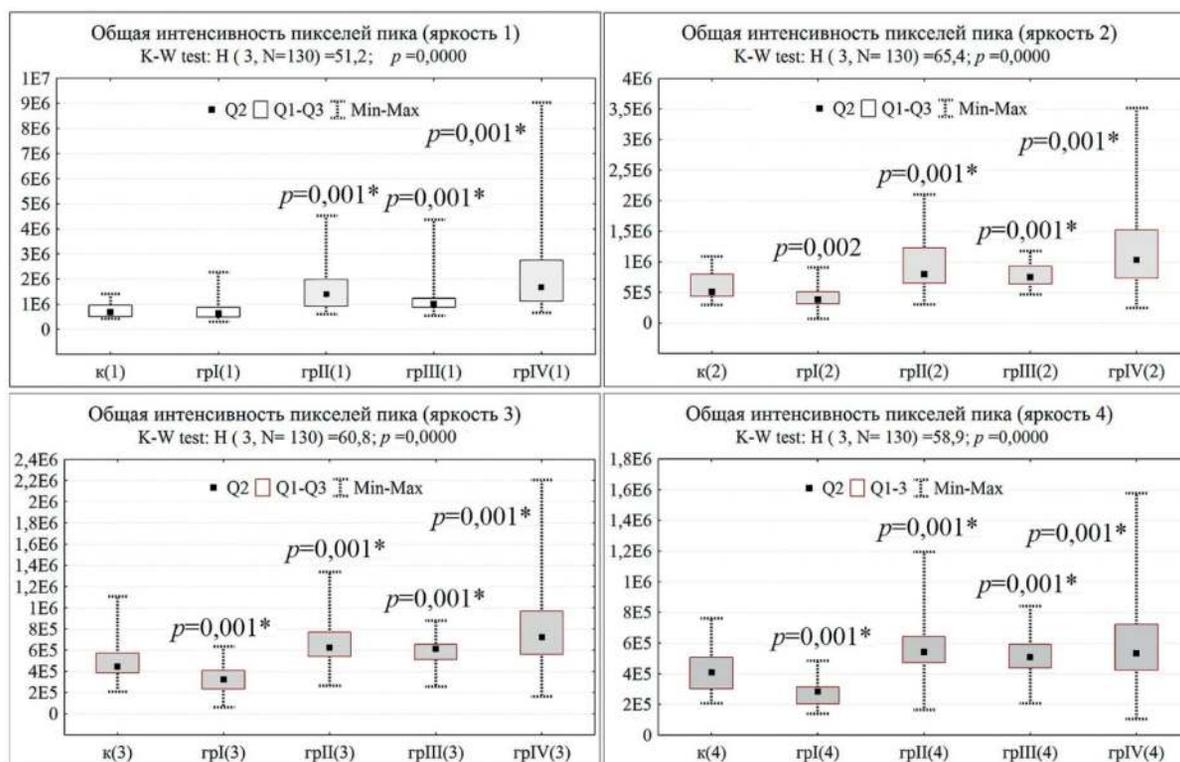


Рис. 6. Общая интенсивность пикселей (ось ординат) в наиболее ярких пиках (1 – 2 – 3 – 4) полей зрения (ROI=90 000 пикселей, $n=30$) *stratum lacunosum* молекулярного слоя полей CA_1 и CA_3 у животных групп I, II, III и IV через 1 сут после ООСА и ПОСА. Данные представлены как Q2 (Q1-Q3), диапазон без выбросов (усы).

Fig. 6. Total intensity of pixels (ordinate axis) in the brightest peaks (1-2-3-4) of the visual fields (ROI=90 000 pixels, $n=30$) of the *stratum lacunosum* of the molecular layer of the CA_1 and CA_3 fields in animals of groups I, II, III and IV 1 day after OSA and POCA. Data are presented as Q2 (Q1-Q3), range without outliers (whiskers).

формировались крупные полости со свободной жидкостью. Это сопровождалось дисфункцией астроцитов, как следствие, необратимой дегидратацией и сморщиванием темных нейронов (пикноморфные с гомогенизацией).

Известно, что острая ишемия приводит к повреждению и отрыву отростков астроцита с образованием замкнутых полостей, прогрессированию отёка-набухания и неизбежной гибели нейронов.

Заключение

Таким образом, после перевязки общей сонной артерии необратимо повреждается система естественной защиты и восстановления ишемически изменённых пирамидных нейронов полей CA₁ и CA₃ гиппокампа – микродренажная функция астроцитов. Дегенерация цитоскелета астроцитарных отростков, их длительный отёк вокруг нейронов и микрососудов вызывают необратимое повреждение и гибель нейронов по механизмам вторичной ишемии – сдавливание капилляров, энергетический дефицит, нарушение глутамат-глутаминового цикла и ионного гомеостаза, активация некроза и апоптоза [13]. Поэтому мы полагаем, что проявления де- и гипергидратации гиппокампа по-

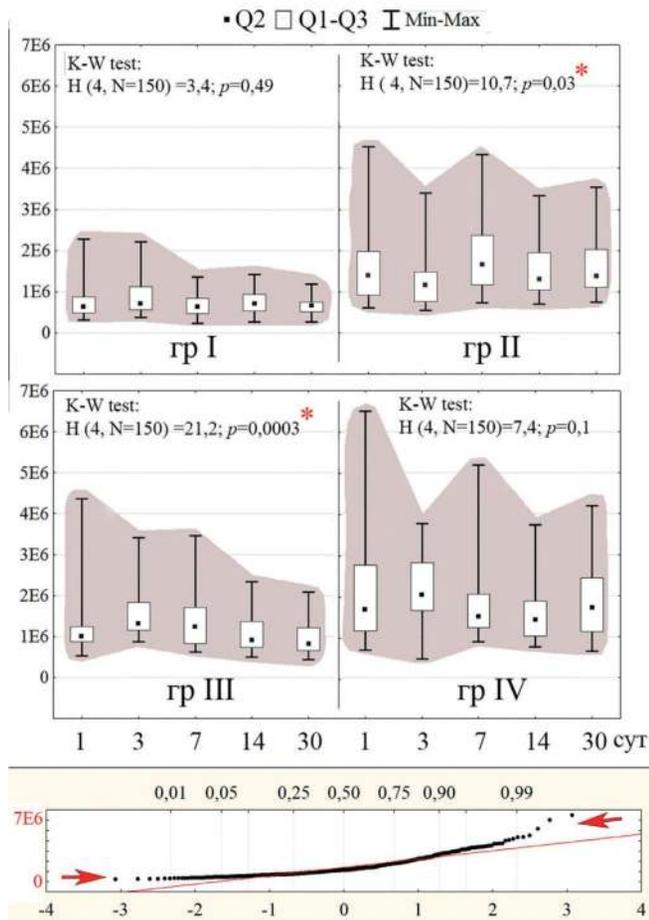


Рис. 7. Общая интенсивность пикселей (ось ординат) в самых ярких пиках (1) полей зрения (ROI=90000 пикселей, n=30) *stratum lacunosum* молекулярного слоя полей CA₁ и CA₃ у животных групп I, II, III и IV в динамике после ООСА и ПОСА. Данные представлены как Q2 (Q1-Q3), диапазон без выбросов (усы). Наглядно показано, что площадь распределения значений в каноническом пространстве в сравниваемых группах отличалась. Относительно группы I – соответственно - 1 : 2,1 : 1,8 : 2,7. Оба конца квантильного графика находятся выше прямой главного тренда (стрелки) – распределение скошено вправо в сторону крупных ярких пиков.

Fig. 7. Total pixel intensity (y-axis) in the brightest peaks (1) of the visual fields (ROI=90000 pixels, n=30) of the *stratum lacunosum* of the molecular layer of the CA1 and CA3 fields in animals of groups I, II, III and IV in dynamics after OSA and POSA. Data are presented as Q2 (Q1-Q3), range without outliers (whiskers). It is clearly shown that the area of distribution of values in the canonical space in the compared groups differed. Relative to group I - respectively - 1 : 2.1 : 1.8 : 2.7. Both ends of the quantile plot are above the main trend line (arrows) – the distribution is skewed to the right towards large bright peaks.

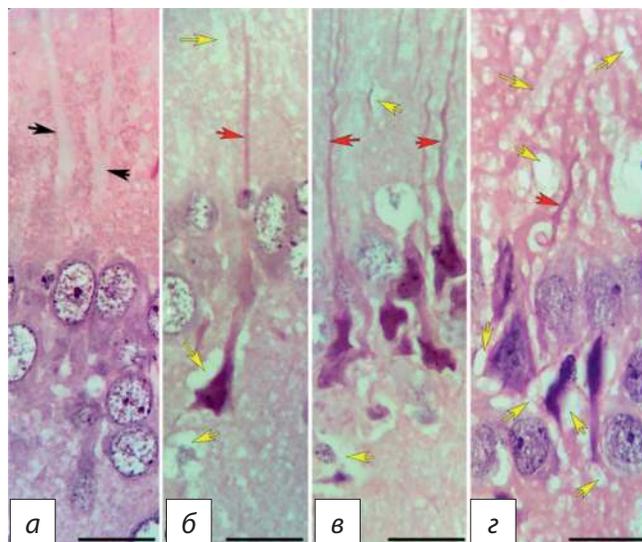


Рис. 8. Фрагменты поля CA₁ гиппокампа животных группы I (а), II (б, в) и IV (з) через 1 (а), 3 (б, в) и 30 (з) сут после ООСА (а-в) и ПОСА (з): преобладание набухания (а; черные стрелки), много темных нейронов с изменёнными дендритами (красные стрелки) без сморщивания (б) и со сморщиванием (в), гипохромные нейроны с признаками гомогенизации, выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлюлярного отёка (б-з; жёлтые стрелки). Окраска гематоксилин-эозином. Объектив: ×100, шкала: 20 мкм.

Fig. 8. Fragments of field CA1 of the hippocampus of animals of groups I (a), II (б, в), and IV (z) 1 (a), 3 (б, в) and 30 (z) days after OSA (a-в) and POSA (z): predominance of swelling (a; black arrows), many dark neurons with altered dendrites (red arrows) without wrinkling (б) and with wrinkling (в), hypochromic neurons with signs of homogenization, pronounced manifestations of edema-swelling of the perikaryon and pericellular edema (б-з; yellow arrows). Hematoxylin-eosin staining. Objective: ×100, scale: 20 micron.

сле окклюзии общей сонной артерии, не сопровождающиеся разрушением отростков астроцитов, можно рассматривать как преимущественно обратимые защитные в рамках реактивного астроглиоза, а в отдалённом периоде после перевязки общей сонной артерии — как признак прижизненных дегенеративных изменений нейронов и астроцитов [18, 19].

Литература

(п.п. 1-13; 15; 16; 19 References)

14. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Сравнительный анализ морфологических нарушений нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при различных видах экспериментальной ишемии головного мозга. *Оренбургский медицинский вестник*. 2021; 9 (2(34)): 29-37.
17. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. 2-е изд. Изд-во: СПб: Питер, 2003. ISBN: 5-272-00078-1.
18. Авдеев Д.Б., Степанов С.С., Горбунова А.В., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М., Акулинин В.А. и др. Темные нейроны сенсорной коры белых крыс после острой неполной ишемии в аспекте артефактов фиксации и нейроглиальных взаимоотношений. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2021; 10(2): 9-22. DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-2-9-22

References

1. Salmond C.H., Chatfield D.A., Menon D.K., Pickard J.D., Sahakian B.J. Cognitive sequelae of head injury: involvement of basal forebrain and associated structures. *Brain*. 2005; 128(1): 189-200. DOI: 10.1093/brain/awh352
2. Spitz G., Bigler E.D., Abildskov T., Maller J.J., O'Sullivan R., Ponsford J.L. Regional cortical volume and cognitive functioning following traumatic brain injury. *Brain Cogn*. 2013; 83(1): 34-44. DOI: 10.1016/j.bandc.2013.06.007
3. Amaral D.G., Scharfman H.E., Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 2007; 163: 3-22. DOI: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5
4. Ramachandran V.S. *Encyclopedia of Human Behavior*. 2nd Edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2012.
5. Schultz C., Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci*. 2014; 34: 6-17. DOI: 10.1159/000360925
6. Adeva M.M., Souto G., Donapetry C., Portals M., Rodriguez A., Lamas D. Brain edema in diseases of different etiology. *Neurochem Int*. 2012; 61(2): 166-74. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.05.007

Сведения об авторах:

Макарьева Любовь Михайловна, очный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОмГМУ, e-mail: lyuba.mamontova.07@gmail.com;

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

Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф. зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, 1. ФГБОУ ВО ОмГМУ; 2. ФГБОУ ВО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru;

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

Коржук Михаил Сергеевич, доктор мед. наук, проф., каф. военно-морской хирургии, ВМА им. С.М. Кирова, e-mail: gensurg@mail.ru;

Шоронова Анастасия Юрьевна, очный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОмГМУ, e-mail: nastasya1994@mail.ru

7. Bai J., Lyden P.D. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. *Int J Stroke*. 2015; 10(2): 143-52. DOI: 10.1111/ijss.12434
8. Belov Kirdajova D., Kriska J., Tureckova J., Anderova M. Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells. *Front Cell Neurosci*. 2020; 14:51. DOI: 10.3389/fncel.2020.00051
9. Dreier J.P., Lemale C.L., Kola V., Friedman A., Schoknecht K. Spreading depolarization is not an epiphenomenon but the principal mechanism of the cytotoxic edema in various gray matter structures of the brain during stroke. *Neuropharmacol*. 2018; 134: 189-207. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.027
10. Ferrer I., Vidal N. Neuropathology of cerebrovascular diseases. *Handb Clin Neurol*. 2017; 145: 79-114. DOI: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00007-9
11. Von Kummer R., Dzialowski I. Imaging of cerebral ischemic edema and neuronal death. *Neuroradiol*. 2017; 59(6): 545-53. DOI: 10.1007/s00234-017-1847-6
12. Wang Y.F., Parpura V. Astroglial modulation of hydromineral balance and cerebral edema. *Front Mol Neurosci*. 2018; 11: 204. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00204
13. Ito U., Hakamata Y., Kawakami E., Oyanagi K. Degeneration of astrocytic processes and their mitochondria in cerebral cortical regions peripheral to the cortical infarction. *Stroke*. 2009; 40(6): 2173-81. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.534990
14. Bon' E.I., Maksimovich N.E. Comparative analysis of morphological disturbances of the neurons of the rats parietal cortex and hippocampus in different types of experimental brain ischemia. *Orenburgskiy meditsinskiy vestnik*. 2021; 9 (2(34)): 29-37. (in Russian)
15. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
16. Herbert A.D., Carr A.M., Hoffmann E. FinDGoci: A focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis. *PLoS ONE*. 2014; 9(12): e114749. DOI: 10.1371/journal.pone.0114749
17. Borovikov V. *Statistica. The art of analyzing data on a computer*. 2nd ed. [Искусство анализа данных на компьютере]. Izdatel'stvo Piter; 2003. ISBN: 5-272-00078-1. (in Russian)
18. Avdeev D.B., Stepanov S.S., Gorbunova A.V., Shoronova A.Yu., Makar'eva L.M., Akulinin V.A., et al. Dark neurons of the sensorimotor cortex of white rats after acute incomplete ischemia in terms of artifacts fixation and neuroglial relationships. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2021; 10(2): 9-22. (in Russian). DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-2-9-22
19. Ahmadvpour S., Behrad A., Fernandez-Vega I. Dark Neurons: A protective mechanism or a mode of death. *Journal of Medical Histology*. 2019; 3(2): 125-31. DOI: 10.21608/JMH.2020.40221.1081