

© Авдеев Д.Б., 2022

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

Авдеев Д.Б.

## Сравнительная морфометрическая характеристика проявлений отёка-набухания миндалевидного тела половозрелых белых крыс после 20-, 30-, 40-минутной окклюзии общих сонных артерий

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

**Цель** – изучение изменений и морфометрическая характеристика проявлений отёка-набухания структур миндалевидного тела белых крыс после 20-, 30- и 40-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА).

**Методика.** Острую ишемию моделировали на белых взрослых крысах Wistar путём 20- (группа I), 30- (группа II) и 40-минутной (группа III) ООСА. Использовали гистологические (окраска гематоксилином-эозином, по Нисслю), иммуногистохимические (MAP-2, GFAP) и морфометрические методы исследования. Морфометрический анализ осуществляли на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, с помощью плагинов программы ImageJ 1.53 (*Find Maxima*, *Find Foci*).

**Результаты.** В миндалевидном теле головного мозга белых крыс после 20-, 30- и 40-минутной ООСА выявлялись признаки цитотоксического отёка-набухания, развивались адаптивные и очаговые деструктивные изменения нейронов и астроглии. Проявления отёка-набухания в разной степени сохранялись на протяжении 7 сут наблюдения. Статистически значимо увеличивалась относительная площадь, количество зон отёка-набухания и степень их гидратации (яркость пикселей). Через 1 и 3 сут после ООСА часть отростков астроцитов миндалевидного тела разрушалась. После односторонней 30-минутной и двусторонней 20-минутной ООСА развивались слабые и умеренные, а после двусторонней 40-минутной ООСА – умеренные и выраженные мелкоочаговые структурно-функциональные изменения с появлением зон просветления «пористого» нейропиля, выраженного периваскулярного и перинейронального отёка отростков астроцитов. Последнее сочеталось с умеренной редукцией общей численной плотности нейронов. В сравнении с контролем в 1-й группе общая численная плотность нейронов уменьшалась на 10,2% ( $p=0,03$ ), в группе 2-й – на 11,4% ( $p=0,03$ ) и в 3-й группе – на 12,9% ( $p=0,01$ ).

**Заключение.** После окклюзии общих сонных артерий в миндалевидном теле на фоне дистрофических и некробиотических изменений нейронов и активации нейроглиальных клеток появлялись признаки отёка-набухания. В большей степени это проявлялось через 3 сут после двусторонней 40-минутной окклюзии. При односторонней окклюзии изменения выявлялись и в полушарии на ипсилатеральной стороне.

**Ключевые слова:** отёк-набухание; острая ишемия; миндалевидное тело; нейроны; астроглия; морфометрия; крысы Wistar

**Для цитирования:** Авдеев Д.Б. Сравнительная морфометрическая характеристика проявлений отёка-набухания миндалевидного тела половозрелых белых крыс после 20-, 30-, 40-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 18-27.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.18-27

**Участие автора:** Авдеев Д.Б. – эксперимент, уход за животными, забор материала, приготовление препаратов, фотографирование препаратов, иллюстративный материал, морфометрический и информационно-математический анализ, обсуждение результатов исследования, написание текста, создание базы данных.

**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 от 24.11.2017 г.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.01.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Avdeev D.B.

## Comparative morphometric characteristics of edema-swelling manifestations in the amygdala of adult white rats after 20-, 30-, and 40-min common carotid artery occlusion

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

**Aim.** To study structural changes and to present a morphometric description of edema-swelling manifestations in the amygdala of rats after 20-, 30-, and 40-min common carotid artery occlusion (CCAO).

**Methods.** Acute ischemia was modeled in white adult Wistar rats by 20- (group I), 30- (group II) and 40-minute (group III) CCAO. Histological (hematoxylin-eosin staining, Nissl staining), immunohistochemical (MAP-2, GFAP) and morphometric methods were used. A morphometric analysis was performed on preparations stained with hematoxylin-eosin using ImageJ 1.53 plug-ins (Find Maxima, Find Foci). Statistical hypotheses were tested (nonparametric tests) with the Statistica 8.0 software.

**Results.** After 20-, 30- and 40-min CCAO, signs of cytotoxic edema-swelling appeared, and focal destructive and adaptive changes in neurons and astroglia were observed in the amygdala. The manifestations of edema-swelling persisted to varying degrees throughout 7 days of observation. The relative area, the number of edema-swelling zones, and the degree of their hydration (pixel brightness) were significantly increased. One and 3 days after CCAO, a part of astrocyte processes in the amygdala was destroyed. After a unilateral 30-min and bilateral 20-min CCAO, mild and moderate, and after a bilateral 40-min CCAO, moderate and pronounced small-focal structural and functional changes developed. These changes were associated with emergence of enlightened zones in the "porous" neuropil and of pronounced perivascular and perineuronal edema of astrocyte processes. Perineuronal edema was associated with a moderate reduction of the overall numerical density of neurons (ONDN). Compared to the control, ODN in group I decreased by 10.2% ( $p=0.03$ ), in group II, by 11.4% ( $p=0.03$ ), and in group III, by 12.9% (Mann-Whitney U-test,  $p=0.01$ ). **Conclusion.** In the amygdala after CCAO, signs of edema-swelling appear on the background of dystrophic and necrobiotic changes in neurons and of the activation of neuroglial cells. These signs were most pronounced 3 days after bilateral 40-min occlusion. With unilateral occlusion, these changes were observed also in the hemisphere on the ipsilateral side.

**Keywords:** edema-swelling; acute ischemia; amygdala; neurons; astroglia; morphometry; Wistar rats

**For citation:** Avdeev D.B. Comparative morphometric characteristics of manifestations of edema-swelling of the amygdala in adult white rats after 20-, 30-, 40-minute occlusion of the common carotid arteries. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 18-27. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.18-27

**Author's contribution:** Avdeev D.B. – experiment, animal care, sampling of material, preparation of preparations, photographing preparations, illustrative material, morphometric and information-mathematical analysis, discussion of research results, text writing, creating a database.

**For correspondence:** *Dmitry B. Avdeev*, candidate of veterinary science, senior lecturer of the department of histology, cytology and embryology, «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 Fund for innovation promotion under the program "UMNIK" №14 from 15.12.2017 and the internal grant of The Omsk state medical University №574 from 24.11.2017.

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

### Information about the authors:

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

Received 14.01.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

## Введение

Миндалевидный комплекс мозга (миндалины, миндалевидное тело, амигдала, — одна из важных структур центральной нервной системы древней коры (архикортекс) головного мозга у млекопитающих [1–3].

Миндалины принимают афферентные импульсы от обонятельного бугорка, перегородки, пириформной коры, височного полюса, височных извилин, орбитальной коры, передней части островка, интралиминарных ядер таламуса, передней части гипоталамуса и ретикулярной формации, имеет связи с гиппокам-

пом [4]. Этот отдел мозга играет важную роль в регуляции вегетативных и моторных реакций, оказывает влияние на эндокринную систему организма, на эмоциональный фон, высшую нервную деятельность, память и сенсорное восприятие [5–7].

Отек-набухание является ответом нервной ткани головного мозга практически на любое патогенное воздействие. Механизмы развития гидропической дистрофии хорошо изучены. Основными причинами отека-набухания в поврежденной нервной ткани являются

ся энергетический дефицит, дисфункция механизмов ионного гомеостаза, нарушение функции астроцитов и микрососудов [8–12].

Установлено, что при ишемии превалирует цитотоксический отёк-набухание головного мозга. Набухание нейронов сопровождается увеличением их размеров, растворением нуклеопротеиновых комплексов, гиперхромией и смещением ядра нейрона. Отёк сопровождается просветлением цитоплазмы, появлением светлых пространств и вакуолей. При необратимой гидропической дистрофии сохраняются ядра, но полностью разрушаются цитоплазматические органеллы [13–15]. Некоторые авторы склонны видеть в процессе отёка-набухания мозга проявления естественного защитного механизма и санации нервной ткани по типу лимфатического дренажа отростками астроцитов. Отёк-набухание мозга, по существу, является частично обратимой плеiotропной реакцией на фоне незначительных повреждений структур и необратимой при тяжёлых изменениях нервной ткани (например, пикноморфные гомогенизированные нейроны, клетки тени) [12, 16].

Однако неизвестно, как на развитие отёка-набухания в миндалевидном ядре влияет продолжительность периода неполной ишемии и при каких гидропических изменениях начинаются нейродегенеративные процессы – патогенетический компонент, а при каких имеет место преимущественно защита нервной ткани – саногенетический компонент. Для углубленного изучения процесса отёка-набухания в этом аспекте необходимо сравнительное экспериментальное гистологическое и морфометрическое исследование его проявлений после острой ишемии разной продолжительности и тяжести (например, односторонней или двухсторонней 20-, 30- и 40-мин). Для этого целесообразно использовать модели неполной ишемии – окклюзия общих сонных артерий (ООСА) [17, 18]. В настоящем исследовании акцент будет сделан на изучении проявлений отёка-набухания в миндалевидном теле (МТ). **Цель** – изучение изменений и морфометрическая характеристика проявлений отёка-набухания структур миндалевидного тела мозга у крыс после 20-, 30- и 40-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА).

### Методика

Экспериментальное морфометрическое исследование выполнено в ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, одобрена локальным этическим комитетом вуза (протокол № 83 от 14 октября 2016 г.; протокол № 112 от 26 сентября 2019 г.). Использовали аутбредных половозрелых крыс Wistar (самцы масса 270–350 г)

Животных содержали в стандартных лабораторных условиях в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными европейским научным фондом и Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным и соблюдением директив Европарламента и Совета европейского союза (2010/63/EU), регламентирующих использование животных в научных целях.

Выбор моделей был основан на подборе неравноценных по продолжительности и тяжести неполной ишемии головного мозга. Использовали одно-, двухстороннюю окклюзию (ООСА) общих сонных артерий. ООСА проводили в течение 30 (группа I,  $n=30$ , односторонняя), 20 (группа II,  $n=30$ , двухсторонняя) и 40 мин (группа III,  $n=30$ , двухсторонняя). Таким образом, использованный подход позволил провести оценку влияния роли продолжительности неполной ишемии на ее исход. Контролем служили интактные животные без манипуляций на общих сонных артериях ( $n=6$ ).

Эксперимент проводили под наркозом: Zoletil 100 (10 мг/кг, 5–7 единиц). С целью фиксации исследуемый мозг перфузировали, вводя последовательно 100–125 мл раствора 0,9% NaCl + 5000 единиц Фрагмина и 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Через 1,5 ч головной мозг перенесли в такой же фиксатр при  $t +4^{\circ}\text{C}$ . После стандартной проводки материал с помощью автомата «STP 120» заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы (толщина 4 мкм) готовили с помощью микротомы HM 450 (Thermo) на уровне миндалевидного тела (МТ) [19].

Изучение структурно-функционального состояния нейронов и глиальных клеток МТ головного мозга белых крыс проводили на гистологических препаратах, окрашенных классическими методами (гематоксилин-эозин, по Нисслю), а также при помощи иммуногистохимических реакций на ассоциированный с микротрубочками белок (*MAP-2*) и кислый фибриллярный белок астроцитов (*GFAP*). *MAP-2* участвует в формировании цитоскелета тел, аксонов и дендритов, а также их пространственной физиологической и патологической реорганизации. *GFAP* локализован главным образом в звездчатых астроцитах, принимает участие практически во всех функциях этих клеток [20].

Для иммуногистохимического исследования использовали поли- и моноклональные антитела. *MAP-2* (ab32454) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (Abcam, США). *GFAP* (PA0026) – мышиные моноклональные антитела, клон GA5, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody);

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

Препараты фотографировали на микроскопе Nikon eclipse e200 (объектив  $\times 4$ ,  $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ ). Использовали камеру для микроскопа ADF STD16. Характеристики данной камеры: разрешение 16.1 Мп, размер матрицы 1/2.2», количество кадров в секунду: 33@2320x1740, интерфейс подключения: USB 3.0, поддержка RAW, а также профессиональное ПО – функции измерения размеров объекта, настройка изображения, запись фото/видео, сшивка полей зрения, мультифокальные изображения, настройка баланса белого и прочие. Изображение сохраняли в файлах с расширением tiff (4632x3488 пикселей).

На полях зрения произвольных участков МТ выделяли области интереса (ROI) – фрагменты молекулярного слоя размером  $20 \times 20$  мкм, формировали стеки (100–120 ROI), рассчитывали среднее значение для каждого поля зрения и животного. Далее формировали и сравнивали вариационные ряды по 30 значений на срок. Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.52 s.

Для морфометрии пиков максимальной яркости (зоны отёка-набухания) на цветных изображениях использовали плагин-фильтр «Find Maxima» M.Schmid из программы ImageJ 1.53 с (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). Предварительно ROI (только нейропилль) подвергалась обработке алгоритмом плагина «Morphological Filters» из пакета «MorphoLibJ» (Radius 1 pix). Это позволяло провести морфологическую сегментацию объекта изучения и стандартизовать изображения. Окончательную оценку пиков поля зрения нейропиля амигдалы в группах I, II и III проводили с помощью плагина Find Foci (набор программ GDSC ImageJ анализа изображений для микроскопии). Метод позволил распределить все пики по размерам и степени яркости путём вычисления, в частности, интегрального показателя «общая интенсивность пикселей в пике» – произведение размера пика в пикселях на яркость пикселей [21].

Для получения статистически значимых результатов в ходе гистологического исследования достаточно 6–8 животных в группе, 5–6 серийных срезов

и 5–10 случайных полей зрения амигдалы (зоны интереса) на каждом срезе [22, 23]. В настоящем исследовании мы сравнивали по 30 рандомизированных полей зрения амигдалы на срок, что достаточно для решения поставленных задач. Проверку характера распределения и статистических гипотез при сравнении групп исследования осуществляли непараметрическими критериями (Shapiro–Wilk test, Mann–Whitney U-test, ANOVA Kruskal–Wallis) 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). Проблема множественного сравнения решалась путём использования ANOVA Kruskal–Wallis [24].

### Результаты и обсуждение

Миндалевидное тело (МТ) является сложным многоядерным центром головного мозга, расположенным под височной корой. МТ состоит из различных мелко-, средне- и крупноклеточных ядер. Крупноклеточные ядра МТ сформированы нормохромными нейронами, а мелкоклеточные – кариохромными и светлыми нейронами. Крупные мультиполярные нейроны имели богатое эухроматином клеточное ядро, упорядоченное расположение элементов гранулярной эндоплазматической сети, выраженный цитоскелет (рис. 1, а, 2, а). Общая численная плотность нейронов (ОЧПН) в средноклеточных ядрах варьировалась (Q2; Q1–Q3) в пределах 490,5 (445,3–534,5), а в крупноклеточных ядрах – 246,5 (203,2–253,2) на  $1 \text{ мм}^2$  поля зрения. Для МТ в целом – 368 (224–512). Далее, для унификации, сравнения между группами проводились с показателем Q2 – медиана для всех ядер.

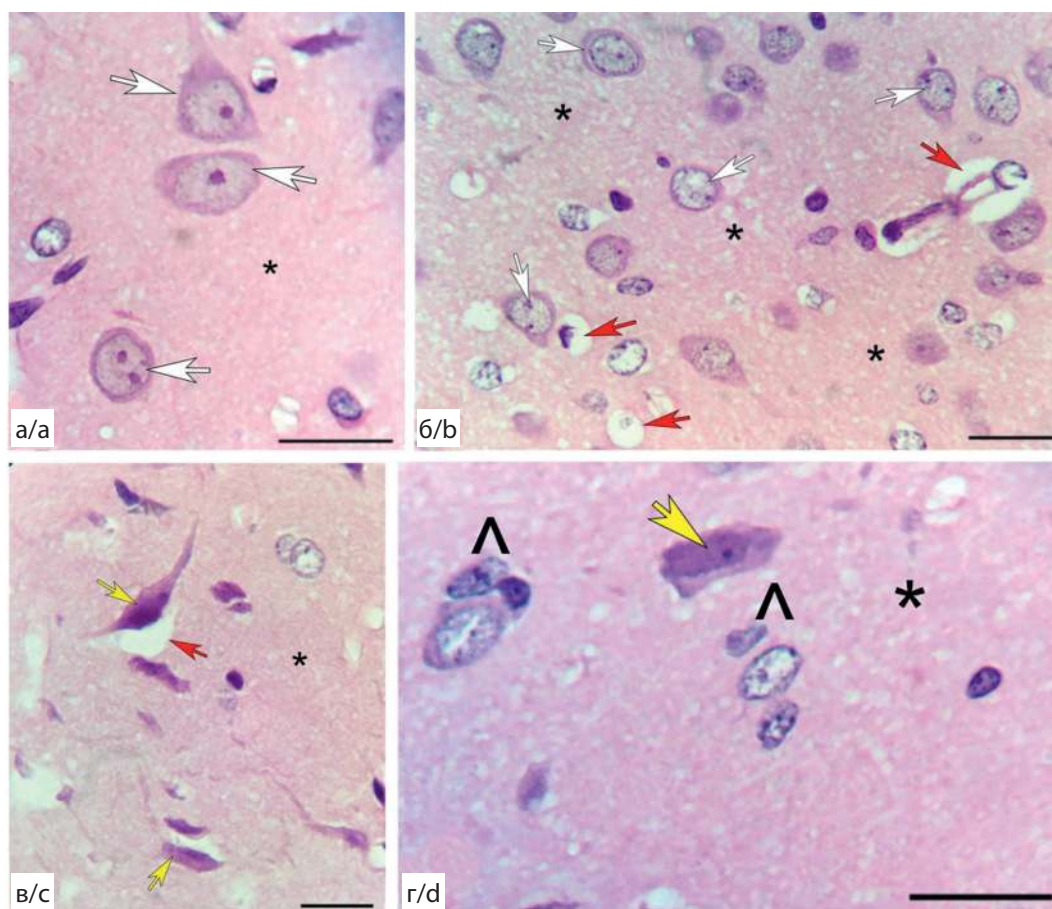
В МТ контрольной группы животных встречались отдельные гиперхромные нейроны, а также очень яркие неокрашенные зоны – просветы пустых сосудов, немногочисленные проявления перичеселлюлярного (ПЦО) и периваскулярного (ПВО) отёка. При этом нейропилль МТ был представлен однородным эозинфильным материалом без признаков набухания составляющих его элементов (дендриты, отростки астроцитов) (рис. 1, а, 2, а, в). Общая интенсивность пикселей зон (пиков) максимальной яркости нейропиля в контроле составляла всего 230 000 (140 000–280 000), что примерно в 10 раз меньше (критерий Манна–Уитни,  $p < 0,0001$ ), чем после ООСА (рис. 3, 4).

После ООСА в ядрах МТ всех групп животных появлялись в основном единичные вакуолизованные нейроны, редко клетки тени, ишемические несморщенные и сморщенные (пикноморфные гомогенизированные и негомогенизированные) тёмные ней-

роны (рис. 1, в, г) Через 1 сут среди изменённых превалировали нейроны с признаками гидропической дистрофии, одиночные клетки-тени и несморщенные тёмные. Через 3 и 7 сут увеличивалось содержание сморщенных тёмных нейронов (в очагах их скопления до 50–60%) и нейронов в состоянии фагоцитоза, увеличивалось количество свободных и сателлитарных нейроглиоцитов (рис. 1, г). По данным иммуногистохимической реакции на *GFAP* астроциты и их отростки гипертрофировались. Особенно это было характерно для зон с большим количеством гиперхромных нейронов (рис. 2, в, г). Основная часть поврежденных нейронов, вероятно, подвергалась фагоцитозу в течении 7 сут после острой ишемии. В сравнение с контролем общая численная плотность нейронов (ОЧПН)

в группе I уменьшалась на 10,2% ( $p=0,03$ ), в группе II – на 11,4% ( $p=0,03$ ), а группе III – на 12,9% (Mann–Whitney U-test,  $p=0,01$ ). Дефицит общей численной плотности нейронов (ОЧПН) сопровождался увеличением нейроглиального индекса (НГИ) от 2,0 (контроль) до 2,8 (Mann–Whitney U-test,  $p=0,01$ ) (через 7 сут).

С помощью плагина «Find Foci» верифицированы пики (участки изображения, отличающиеся от соседних средними значениями интенсивности пикселей). В контроле, на чёрном фоне, преобладали пики небольших размеров с различными оттенками серого, яркие светлые участки немногочисленны. Не было экстремальных выбросов значений их характеристик (размеры, средняя интенсивность, общая интенсивность пикселей в пике) (рис. 3).



**Рис. 1.** Поля зрения миндалевидного тела контрольных животных (а), через 1 сут (б, г) и 7 (в) сут после ООСА: визуальные качественные различия реакции нейронов и проявлений отёка-набухания нейропила (\*). Жёлтые стрелки – гиперхромные, белые стрелки – нормохромные нейроны. Красные стрелки – периваскулярный и перичеселлюлярный отёк. Окраска гематоксилином и эозином, Об.  $\times 100$ , масштабный отрезок – 20 мкм.

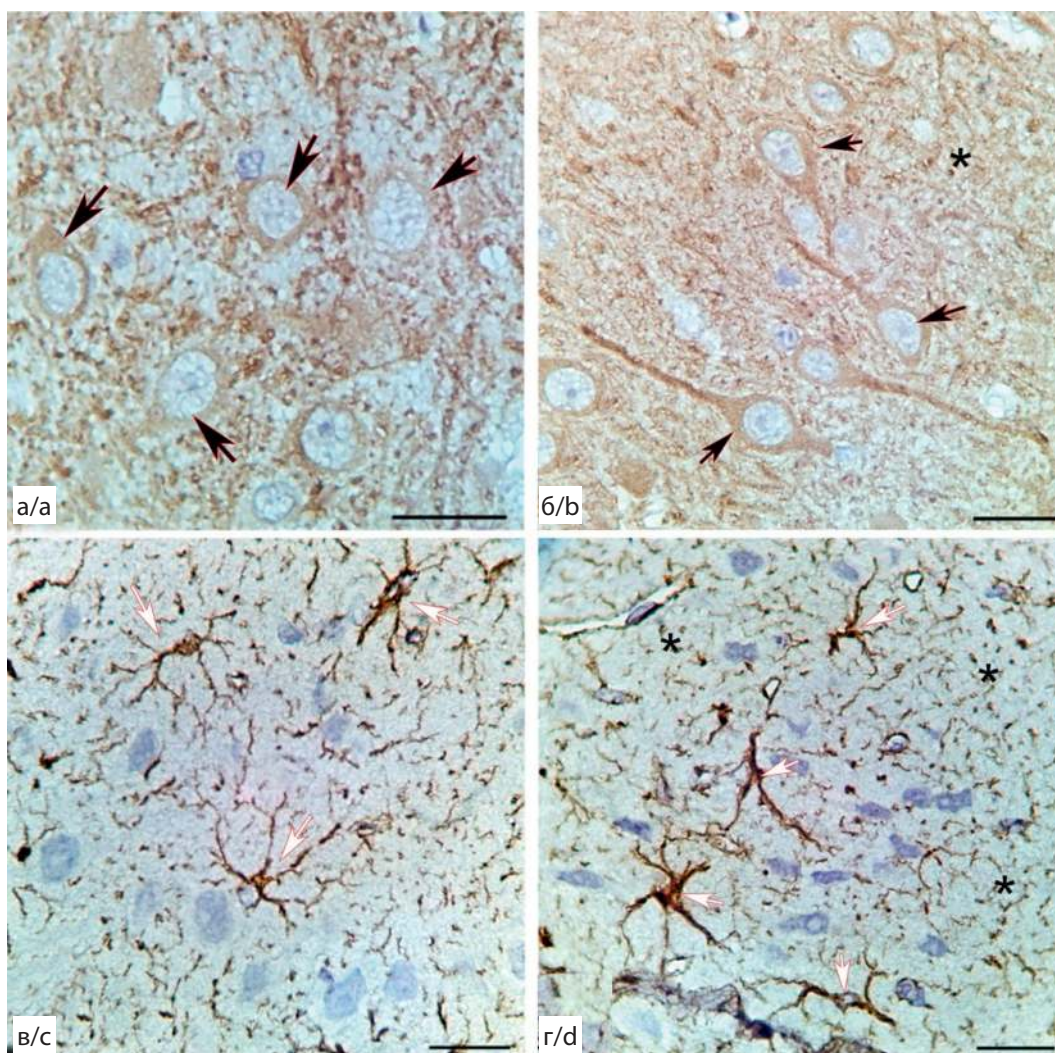
**Fig. 1.** Fields of view of the amygdala of control animals (a), 1 (b, d) and 7 (c) days after CCAO: visible qualitative differences in neuron responses and signs of edema-swelling of the neuropil (\*). Yellow arrows, hyperchromic neurons; white arrows, normochromic neurons; red arrows, perivascular and pericellular edema. Hematoxylin and eosin staining; lens,  $\times 100$ ; scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

После ООСА количество ярких пиков существенно увеличивалось (в 10–15 раз). Именно по количеству, размерам и яркости этих пиков проводилось сравнение между экспериментальными группами (интегральный показатель – «общая интенсивность пикселей в пиках»).

При сравнении МТ правого и левого полушария незначительные статистически значимые различия по общей интенсивности пикселей максимально ярких пиков выявлены через 1 сут после ООСА в группе II (односторонняя 30 мин ООСА). На сторо-

не окклюзии проявления отёка-набухания были более выражены. Через 3 и 7 сут асимметрии по данной переменной различий не выявляли (рис. 4). Вероятно, это свидетельствовало о восстановлении кровотока в эти сроки.

ООСА, вероятно, приводила к существенному перераспределению воды в МТ. Так, в остром периоде (1 и 3 сут) появлялись поля зрения МТ со структурными проявлениями перипеллюлярного (ПЦО) и периваскулярного (ПВО) отёка астроцитов. В боль-

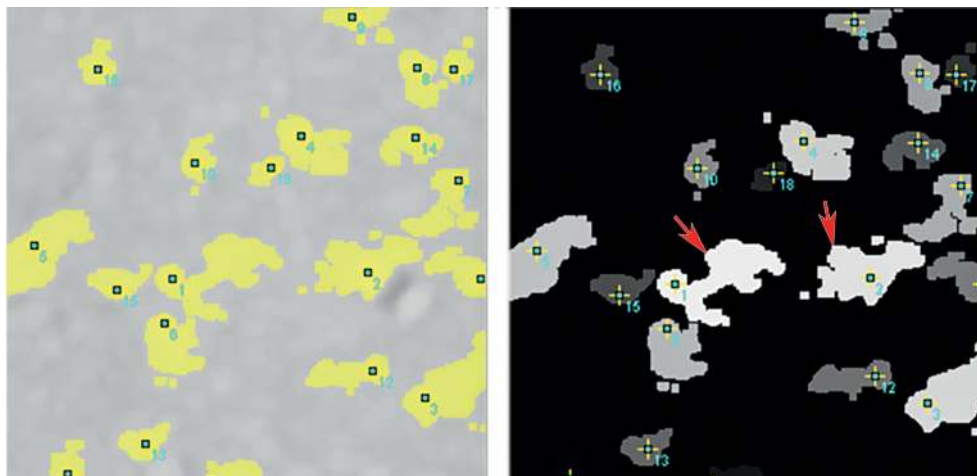


**Рис. 2.** Поля зрения миндалевидного тела контрольных животных (а, в) и через 3 (б, г) сут после ООСА: после ишемии цитоскелет нейронов прокрашивается более интенсивно, увеличивается количество гипертрофированных астроцитов. \* – нейропилль, черные стрелки – нейроны, белые стрелки – астроциты. Окраска: иммуногистохимическая реакция на MAP-2 (а, б) и GFAP (в, г) докраска гематоксилином. Об.  $\times 100$ , масштабный отрезок – 20 мкм.

**Fig. 2.** Fields of view of the amygdala of control animals (a, c) and 3 (b, d) days after CCAO. After ischemia, the cytoskeleton of neurons was stained more intensively, the number of hypertrophic astrocytes increased. \*, neuropil; black arrows, neurons; white arrows, astrocytes. Staining: immunohistochemical reaction for MAP-2 (a, b) and GFAP (c, d) followed by hematoxylin staining; lens,  $\times 100$ ; scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

шей степени это было характерно для микрососудов и пикноморфных нейронов животных группы II и III (рис. 1, б, в), как раз там, где располагается основная масса отростков астроцитов. В более отдалённом периоде (7 сут после ООСА) в группах I и II отмечена

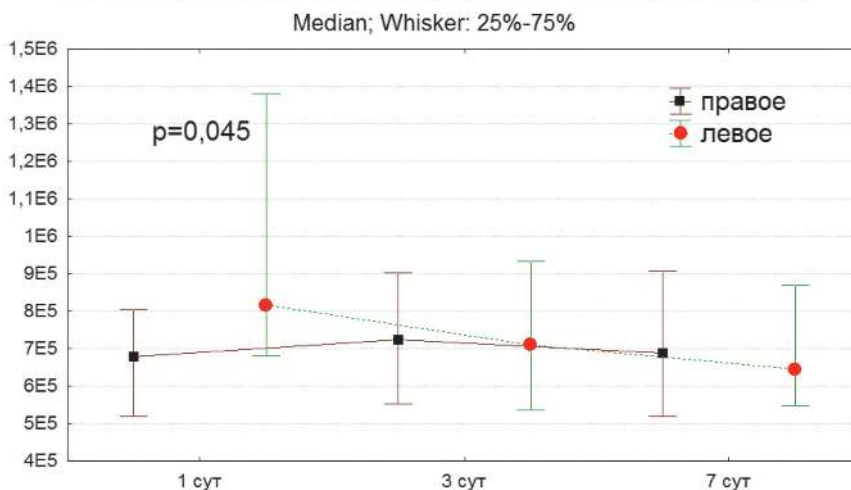
незначительная редукция проявлений отёка набухания. Гидропические изменения астроцитов сочетались с появлением тёмных сморщенных и несморщенных нейронов на протяжении всего периода наблюдения (рис. 1, б, в, г; рис. 5).



**Рис. 3.** Участки (ROI=20×20 мкм; 32 бит, градации серого) нейропиля миндалевидного тела у крысы группы III: все пики (отмечено жёлтым) отличались формой и размерами, на чёрном фоне отмечены пики с разной яркостью, наиболее яркие светлые пики (отмечено красными стрелками) соответствуют небольшим очагам отёка-набухания. Окраска гематоксилин-эозином, трансформация изображений с помощью плагина «Find Foci». Объектив ×100.

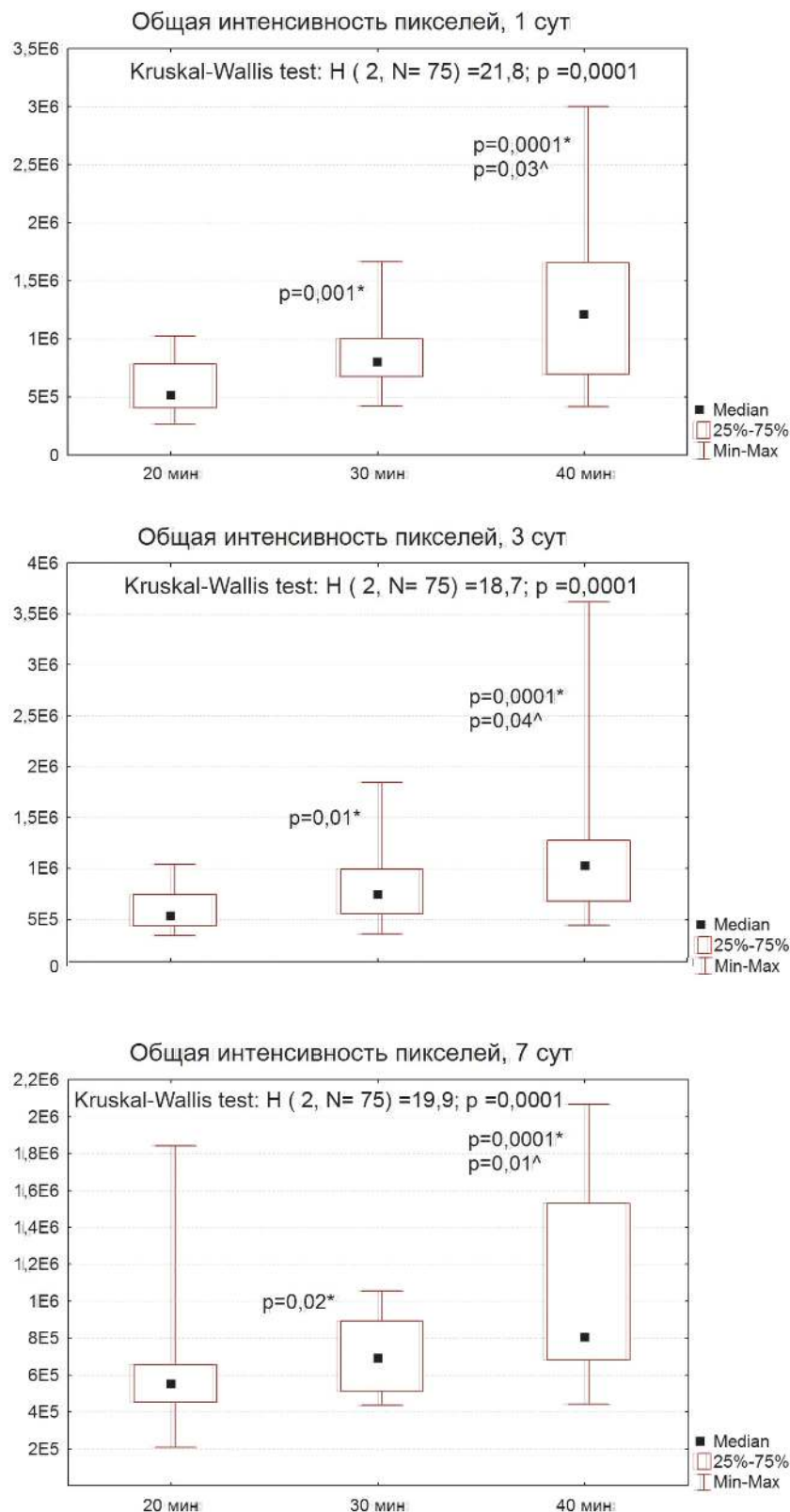
**Fig. 3.** Areas (ROI = 20×20 μm; 32 bits, grayscale) of the amygdala neuropil in a group III rat: all peaks (marked in yellow) differed in shape and size, peaks with different brightness are marked on a black background, the brightest light peaks (marked in red arrows) correspond to small foci of edema-swelling. Hematoxylin-eosin staining, image transformation using the “Find Foci” plugin. Lens ×100.

Общая интенсивность пикселей (правое и левое полушария)



**Рис. 4.** Общая интенсивность пикселей (ось ординат, миллионы) в пиках полей зрения (ROI=90000 пикселей, n=25) миндалевидного тела у животных групп II в динамике после ООСА в правом и левом полушарии головного мозга. Данные представлены как Q2 (Q1-Q3). Статистически значимые различия в сравнении с 1 сут (Mann-Whitney U-test) при p<0,05.

**Fig. 4.** Total intensity of pixels (y-axis, millions) in the peaks of the visual fields (ROI=90000 pixels, n=25) of the amygdala in animals of groups II in dynamics after OSA in the right and left hemispheres of the brain. Data are presented as Q2 (Q1-Q3). Statistically significant differences compared to 1 day (Mann-Whitney U-test) at p<0.05.



**Рис. 5.** Общая интенсивность пикселей (ось ординат, миллионы) в пиках полей зрения (ROI=20×20 мкм, n=25) миндалин тела у животных групп I, II и III в динамике после ООСА. Данные представлены как Q2 (Q1-Q3) и диапазон без выбросов (усы). При множественном сравнении переменной по группам выявлены статистически значимые различия (ANOVA Kruskal–Wallis;  $p < 0,001$ ) между группами по всем срокам. \* – статистически значимые различия в сравнении с группой I, ^ – с группой II (Mann–Whitney U-test) при  $p < 0,05$ .

**Fig. 5.** The total intensity of pixels (y-axis, millions) in the peaks of the visual fields (ROI=20×20 micrometers, n=25) of the amygdala in animals of groups I, II and III in dynamics after OSA. Data are presented as Q2 (Q1-Q3) and non-outlier range (whiskers). Multiple comparisons of the variable across groups revealed statistically significant differences (ANOVA Kruskal–Wallis;  $p < 0,001$ ) between groups across all terms. \* – statistically significant differences in comparison with group I, ^ – with group II (Mann–Whitney U-test) at  $p < 0,05$ .



Таким образом, в МТ, как в сенсомоторной коре [25] и гиппокампе [26] после ООСА выявлены слабые, умеренные и сильные структурные проявления отёка-набухания.

Проведённые сравнения показали существование дозозависимых, от продолжительности ишемии, переходов от незначительных изменений нейронов и астроцитов МТ по типу набухания (через 1 сут после двусторонней 20-мин и односторонней 30-мин ООСА) до выраженных очаговых проявлений отёка-набухания (через 3 сут после двусторонней 40-мин ООСА). Это можно трактовать как последовательный сбалансированный процесс обмена жидкости между клетками МТ. После односторонней 30-мин и двусторонней 20-мин ООСА отмечалась в основном гипергидратация нейронального компартмента. После 40-мин ООСА выявлялись выраженные признаки гипергидратации астроцитарного компартмента и дегидратации нейронов (пикноморфные нейроны). При этом во всех группах, вероятно, сохранялись потенциальные возможности структурно-функционального восстановления большей части тёмных несморщенных нейронов и отёчной астроглии. Однако в наиболее повреждённых участках МТ после 40-мин ООСА происходил срыв механизмов оттока жидкости по астроцитам, формировались периваскулярные и перинейрональные зоны со свободной жидкостью. В таких зонах, вероятно, сочетались дисфункция ионных насосов нейронов, астроцитов и эндотелиальных клеток микрососудов и, как следствие, происходила необратимая дегидратация и сморщивание нейронов (с последующим их фагоцитозом) на фоне отёка конечных отделов отростков астроцитов. По данным литературы, после острой ишемии наблюдалось повреждение и отрыв отростков астроцитов с образованием полостей, прогрессированием отёка-набухания и неизбежной гибелью нейронов [13, 14, 23, 27].

Следовательно, использование плагина *Find Foci* [21] для количественной оценки гидратации нервной ткани миндалевидного тела путем определения структуры пикселей изображения по степени их яркости и размера светлых зон позволило разделить физиологические и патофизиологические проявления – набухание и отек. Идеология и методическая основа подобного подхода для оценки степени гидратации нервной ткани более подробно представлены нами ранее при изучении сенсомоторной коры и гиппокампа белых крыс [17, 20, 25]. Стандартизация процесса получения количественных данных позволяет выявлять особенности разных отделов головного мозга при развитии отека-набухания и оценить его динамику. Это

важно при интерполяции и экстраполяции характеристик структурно-функциональных изменений.

### Заключение

Таким образом, после 40-мин, в отличие от 20- и 30-мин ООСА, необратимо повреждается система естественной защиты и восстановления ишемически изменённых нейронов МТ и, вероятно, микродренажная функция астроцитов. Это неизбежно приводит к необратимым повреждениям и гибели части нейронов МТ по механизмам вторичной ишемии. Поэтому мы полагаем, что проявления де- и гипергидратации гиппокампа после 20- и 30-мин ООСА можно рассматривать преимущественно как обратимые защитные, а после 40-мин ООСА – как признак прижизненных дегенеративных изменений нейронов (сморщивание) и астроцитов (отёк). Аналогичные представления найдены и в работах других авторов [13, 17, 23, 28].

Следовательно, в настоящей работе получены новые сведения о морфофункциональных особенностях реакции МТ крыс линии Wistar на ООСА. Дана количественная оценка структурным проявлениям отёка-набухания, что способствует большему пониманию патологических и адаптивных процессов в нервной ткани.

### Литература

(п.п. 1–3; 6–16; 19; 21–23; 27; 28 см. References)

- Костюк П. Г. *Частная физиология нервной системы*. Л.: Наука, 1983.
- Мглоблишвили М.М. Влияние повреждения миндалевидного комплекса на условно-рефлекторную активность и краткосрочную память животных. *Сообщ. АН Груз. ССР*. 1971; 62(3): 685.
- Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Горбунова А.В., Степанов С.С., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М. и др. Отёк-набухание как стандартная дозозависимая реакция зубчатой извилины гиппокампальной формации на острую ишемию. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2021; 10(3): 15–26. DOI:10.18499/2225-7357-2021-10-3-15-26
- 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.
- 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: <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.01.17-27>
- Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. 2-е изд. Изд-во: СПб: Питер, 2003; 688 с. ISBN: 5-272-00078-1.
- Степанов С.С., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М., Коржук М.С. Сравнительная морфометрическая характеристика проявлений отека-набухания сенсомоторной коры большого мозга половозрелых белых крыс после 20, 30-, 40-минутной окклюзии общих сонных артерий.

- Общая реаниматология.* 2021; 17(5): 111-28. DOI: 10.15360/1813-9779-2021-5-111-128
26. Горбунова А.В., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М. Закономерности реорганизации нейроглиальных взаимоотношений в гиппокампальной формации белых крыс после кратковременной окклюзии общих сонных артерий: *Национальный конгресс с международным участием «Здоровые дети — будущее страны»*. С.-П., 26-28 мая 2021 г.
- ### References
1. Burwell R.D., Amaral D.G. Perirhinal and postrhinal cortices in the rat: Interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J. Comp. Neurol.* 1998; 391: 293–321.
  2. Chandler H.C., King V., Corwin J.V., Reep R.L. Chandler, H. C. Thalamocortical connections of rat posterior parietal cortex. *Neurosci. Lett.* 1992; 143: 237–42.
  3. Wu T., Nagaya Y., Hanada T. Pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions of perampanel and other antiepileptic drugs in a rat amygdala kindling model. *Seizure.* 2014; 23(9): 732-9. DOI: 10.1016/j.seizure.2014.06.001
  4. Kostyuk P.G. *Private physiology of the nervous system. [Chastnaya fiziologiya nervnoy sistemy]*. Leningrad: Nauka, 1983. (in Russian)
  5. Mgaloblishvili M.M. The effect of damage to the amygdala complex on conditioned reflex activity and short-term memory of animals. *Soobshcheniya AN Gruz. SSR.* 1971; 62(3): 685. (in Russian)
  6. Morrison S.E., Salzman C. D. Re-valuing the amygdala. *Current opinion in neurobiology.* 2010; 20(2): 221-30. DOI: 10.1016/j.conb.2010.02.007
  7. Bazyan A.S., Van Luijtelaaar G. Neurochemical and behavioral features in genetic absence epilepsy and in acutely induced absence seizures. *Neurology.* 2013; 875834. DOI: 10.1155/2013/875834
  8. 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
  9. Bai J., Lyden P.D. Revisiting cerebral posts ischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. *Int J Stroke.* 2015 Feb 10(2): 143-52. DOI: 10.1111/ijs.12434
  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. 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 May 15; 134: 189-207. DOI: 10.1016/j.neuropharm. 2017.09.027
  12. Belov Kirdajova D., Kriska J., Tureckova J., Anderova M. Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells. *Front Cell Neurosci.* 2020 Mar 19; 14: 51. DOI: 10.3389/fn-cel.2020.00051
  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 Jun 40(6): 2173–81. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.534990
  14. Von Kummer R., Dzialowski I. Imaging of cerebral ischemic edema and neuronal death. *Neuroradiol.* 2017 Jun 59(6): 545-53. DOI: 10.1007/s00234-017-1847-6
  15. Wang Y.F., Parpura V. Astroglial modulation of hydromineral balance and cerebral edema. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 12; 11: 204. DOI:10.3389/fnmol.2018.00204
  16. Kim Y.K., Leem J.G., Shin J.W., Joung K.W. Ischemic post-conditioning may not influence early brain injury induced by focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Korean J Anesthesiol.* 2010 Feb; 58(2): 176-83. DOI:10.4097/kjae.2010.58.2.176
  17. Avdeev D.B., Akulinin V.A., Gorbunova A.V., Stepanov S.S., Shorono A.Yu., Makar'eva L.M., et al. Edema-Swelling as a Standard Dose-Dependent Response of the Dentate Gyrus of the Hippocampal Formation to Acute Ischemia. *Zhurnal anatomii i gistopatologii.* 2021; 10(3): 15–26. (in Russian). DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-3-15-26
  18. 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)
  19. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
  20. Makarieva L.M., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Korzhuk M.S., Shorono 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.* 2022; 66(1): 17–27. (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.01.17-27>
  21. Herbert A.D., Carr A.M., Hoffmann E. FindFoci: a focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis. *PLoS One.* 2014; 9(12): e114749. DOI: 10.1371/journal.pone.0114749
  22. Bolon B., Garman R., Jensen K., et al. Best practices approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing. *Toxicol. Pathol.* 2006; 34: 296–313.
  23. Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S., Naoki O., Atsushi O., Terushige T., Katsuji S. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol.* 2006; 112(4): 471–81. DOI: 10.1007/s00401-006-0108-2
  24. Borovikov V. *Statistica. The art of analyzing data on a computer.* 2nd ed. Izdatel'stvo Piter; 2003. (in Russian)
  25. Stepanov S.S., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Shorono A.Yu., Makar'eva L.M., Korzhuk M.S. Relation between the severity of the sensorimotor cortical edema with cell swelling and the duration of common carotid artery occlusion in rats (morphometric study). *Obshchaya reanimatologiya.* 2021; 17(5): 111-28. (in Russian). DOI: 10.15360/1813-9779-2021-5-111-128
  26. Gorbunova A.V., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Avdeev D.B., Shorono A.Yu., Makar'eva L.M. *Patterns of reorganization of neuroglial relationships in the hippocampal formation of white rats after short-term occlusion of the common carotid arteries: National congress with international participation "Healthy children are the future of the country". [Zakonomernosti reorganizatsii neyroglial'nykh vzaimootnosheniy v gippokampal'noy formatsii belykh krysv posle kratkovremennoy okklyuzii obshchikh sonnykh arteriy: Natsional'nyy kongress s mezhdunarodnym uchastiem «Zdorovyete deti — budushchee strany»*. Sankt-Peterburg, 26-28 maya 2021 gya reanimatologiya: «Zdorovyete deti — budushchee strany»]. Saint Petersburg, may 26-28, 2021. (in Russian)
  27. Pekny M., Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev.* 2014; 94(4): 1077–98. DOI: 10.1152/physrev.00041.2013
  28. Ahmadpour S., Behrad A., Fernández-Vega I. Dark neurons: A protective mechanism or a mode of death. *J. Med. Histolog.* 2019; 3(2): 125–31. DOI: 10.21608/JMH.2020.40221.1081

**Сведения об авторе:**

**Авдеев Дмитрий Борисович**, канд. вет. наук, доцент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, Омский государственный медицинский университет, e-mail: avdeev86@inbox.ru