

DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-2-9-22

УДК 591.481.1+616-005.4-092.9

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

© Коллектив авторов, 2021



Темные нейроны сенсомоторной коры белых крыс после острой неполной ишемии в аспекте артефактов фиксации и нейроглиальных взаимоотношений

Д. Б. Авдеев¹, С. С. Степанов¹, А. В. Горбунова¹, А. Ю. Шоронова¹,
Л. М. Макарьева¹, В. А. Акулинин^{1, 2*}, М. С. Коржук^{1, 2}, М. В. Заболотных²

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск, Россия

²ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина», Омск, Россия

Цель – изучить морфофункциональные признаки формирования «темных нейронов» сенсомоторной коры (СМК) большого мозга половозрелых белых крыс в норме и после 40-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА).

Материал и методы. Острую ишемию моделировали на белых крысах Wistar путем 40-минутной ООСА. Головной мозг фиксировали иммерсионным и перфузионным способами. Проводили сравнительную морфометрическую оценку цито- и глиоцитархитектоники неокортекса в норме (n=6), через 1 (n=6), 3 (n=6) и 7 сут (n=6) после ООСА. Использовали окраски по Ниссля, гематоксилином и эозином, иммуногистохимическое типирование NSE, MAP-2, HSP-70, p38, CASP3, GFAP и AIF1. Определяли численную плотность нормохромных и гиперхромных (темных) пирамидных нейронов, олигодендроцитов (ОДЦ), микроглиоцитов (МГЦ), а также относительную площадь зон отека–набухания. Проверку статистических гипотез проводили с помощью непараметрических методов в программе Statistica 8.0.

Результаты. Способ фиксации головного мозга существенно влиял на содержание артефактных темных нейронов (АТН), которые по морфологии и тинкториальным свойствам похожи на дегенеративно измененные темные нейроны (ДТН). Появление обратимо и необратимо измененных ДТН после ООСА в СМК сопровождалось увеличением относительной площади зон отека–набухания (контроль – 5.4%, 1-е сут – 17.6%). Максимальное содержание ДТН (53%) выявлено в слое V через 7 сут после ишемии. По данным иммуногистохимического типирования NSE, MAP-2, HSP-70, p38, CASP3, специфические белки большей части ДТН сохранялись, обеспечивая их восстановление и функционирование нейронных сетей. Общая численная плотность нейронов СМК через 7 сут в слое III уменьшалась на 26.4% (p=0.001), а в слое V – на 18.5% (Mann–Whitney U Test; p=0.01). Выявленные изменения носили диффузно-очаговый характер. В зонах скопления ДТН увеличивалось содержание астроцитов, микроглиоцитов (МГЦ) и олигодендроцитов (ОДЦ). Нейро-астроглиальный индекс (контроль – 1.62) через 3 сут после ООСА увеличивался до 2.72. Пик численной плотности МГЦ отмечен через 1 сут, а ОДЦ – через 7 сут после острой неполной ишемии (Mann–Whitney U Test; p≤0.001).

Заключение. После 40-минутной окклюзии общих сонных артерий в слоях III и V сенсомоторной коры на фоне гидропической дистрофии были выявлены темные нейроны, цитоморфологические характеристики которых свидетельствовали о наличии динамики их прижизненных дегенеративных изменений. Восстановление дегенеративно измененных темных нейронов сопровождалось увеличением количества сателлитарных олигодендроцитов, астроцитов и микроглиоцитов. Выявленные изменения рассматривались как один из вариантов обратимых изменений нейронов в ответ на умеренное ишемическое повреждение.

Ключевые слова: острая ишемия; неокортекс; темные нейроны; астроглия; микроглия; иммуногистохимия; морфометрия; крысы Wistar.

Dark Neurons of the Sensorimotor Cortex of White Rats after Acute Incomplete Ischemia in Terms of Artifacts Fixation and Neuroglial Relationships

© D. B. Avdeev¹, S. S. Stepanov¹, A. V. Gorbunova¹, A. Yu. Shoronoova¹, L. M. Makar'eva¹, V. A. Akulinin^{1, 2*}, M. S. Korzhuk^{1, 2}, M. V. Zabolotnykh²

¹Omsk State Medical University, Omsk, Russia

²P.A. Stolypin Omsk State Agrarian University, Omsk, Russia

The aim of research was to study morphofunctional signs of the sensorimotor "dark neurons" formation in the cerebrum of sexually mature white rats under normal conditions and in 40 minutes after the common carotid arteries (CCA) occlusion.

Material and methods. Acute ischemia was simulated in white Wistar rats by a 40-min CCA occlusion. The brain was fixed by immersion and perfusion methods. A comparative morphometric assessment of cyto- and gliocytoarchitectonics of the neocortex was carried out under normal conditions (n = 6), 1 (n = 6), 3 (n = 6), and in

7 days ($n = 6$) after the common carotid arteries (CCA) occlusion. The Nissl staining, hematoxylin and eosin staining, immunohistochemical typing NSE, MAP-2, HSP-70, p38, CASP3, GFAP and AIF1 were applied. The numerical density of normochromic and hyperchromic (dark) pyramidal neurons, oligodendrocytes, microglia, and the relative area of edema – swelling zones were determined. Statistical hypotheses were tested by nonparametric methods using Statistica 8.0 software.

Results. The method of the brain fixation significantly influenced the content of the artifact dark neurons, which are similar in morphology and tinctorial properties to degeneratively altered dark neurons. The appearance of reversibly and irreversibly degeneratively altered dark neurons in the sensorimotor cortex after the CCA occlusion was accompanied by an increase in the relative area of edema – swelling zones (control – 5.4%, 1st day – 17.6%). The maximum content of degeneratively altered dark neurons (53%) was found in layer V in 7 days after ischemia. According to the findings of immunohistochemical typing NSE, MAP-2, HSP-70, p38, CASP3, the specific proteins of the most degeneratively altered dark neurons were retained, ensuring their restoration and the neural network functioning. The total number density of sensorimotor neurons decreased by 26.4% ($p = 0.001$) in layer III, and by 18.5% in layer V (Mann – Whitney U Test; $p = 0.01$) in 7 days after the intervention. The revealed changes were of a diffuse focal character. In the zones of degeneratively altered dark neurons accumulation, the content of astrocytes, microglia and oligodendrocytes increased. The neuro-astroglial index (control – 1.62) increased to 2.72 in 3 days after the CCA occlusion. The peak in the number density of microglia was noted in 1 day, and the oligodendrocytes in 7 days after acute incomplete ischemia (Mann – Whitney U Test; $p \leq 0.001$).

Conclusion. After a 40-minute common carotid arteries occlusion, dark neurons were detected in layers III and V of the sensorimotor cortex with underlying hydropic dystrophy; their cytomorphological properties indicated the dynamics of their in vivo degenerative changes. Restoration of degeneratively altered dark neurons was accompanied by an increase in the number of satellite oligodendrocytes, astrocytes and microglia. The revealed changes were considered as one of the variants of reversible changes in neurons in response to moderate ischemic damage.

Key words: acute ischemia, neocortex; dark neurons; astroglia; microglia; immunohistochemistry; morphometry; Wistar rats.

***Автор для переписки:**

Акулинин Виктор Александрович
Омский государственный медицинский университет, ул.
Ленина, 12, г. Омск, 644099, Российская Федерация

***Corresponding author:**

Victor Akulinin
Omsk State Medical University, ul. Lenina, 12, Omsk, 644099,
Russian Federation

E-mail: v_akulinin@outlook.com

Введение

Одной из общих проблем нейроморфологии и нейрофизиологии является правильная трактовка роли различных типов поврежденных и неповрежденных нейронов. Суть ее в том, что при морфологических исследованиях нет абсолютной уверенности в прижизненности выявленных структурных изменений нейронов. По данным литературы, после ишемии в головном мозге выявляются признаки дистрофии (гидропической, белковой), атрофии, апоптоза, некроза (коллакционного и коагуляционного), фагоцитоза и аутофагоцитоза, а также – гиперплазии и гипертрофии [21, 26, 37, 41]. Эти изменения сопровождаются отеком–набуханием, вакуолизацией, гипохромией (локальным, субтотальным, тотальным разрушением нуклеопротеинов), уплотнением матрикса, гиперхромией ядра и цитоплазмы (без и со сморщиванием, кареорексисом и гомогенизацией клеточных структур). Все они имеют функциональный эквивалент – активация, деактивация, блокада и т.д. [3, 6, 31, 32, 34, 40, 41]. Наиболее сложно трактовать причины и последствия образования «темных нейронов». Это связано с тем, что гиперхромия может быть результатом не только прижизненных дегенеративных изменений в ответ на патологическое воздействие,

но и проявлением артефактов при взятии материала [27].

В связи с этим выделяют обратимо, необратимо измененные дегенеративные темные нейроны (ДТН) в ответ на патологическое воздействие при жизни животного и артефактные темные нейроны (АТН), формирующиеся в ответ на манипуляции, связанные со взятием материала [25]. Существенно то, что АТН и ДТН имеют сходную морфологию [24]. Отличительной особенностью начальных изменений всех типов темных нейронов (ТН) является гипербазофилия, гипераргирофилия, гиперэлектронная плотность и резкое уплотнение ультраструктурных элементов в области перикариона и дендритов [12, 23, 24, 30]. Тем не менее, важным признаком АТН является однородность (мономорфность) внешнего вида соседних нейронов. При несоблюдении стандартов работы с биологическим материалом разные по площади поля однотипных АТН появляются на фоне интактного нейрона (без признаков отека–набухания отростков) и активации нейроглии [24].

Обратимая прижизненная нейрональная дегенерация в ответ на развитие дистрофических процессов проявляется уплотнением перикариона без признаков деструкции его структурных элементов. Типовое морфологическое проявление необратимой прижизненной нейрональной дегенерации (не апоптозные некробиотические изменения) известно как «пикноморфный нейрон», «острая эозинофильная дегенерация нейронов», «коагуляционный некроз», иногда употребляется название «красные мертвые нейроны». Для таких нейронов характерно уменьшение

объема перикариона, утрата базофильного вещества, интенсивная эозинофилия цитоплазмы, мелкие и сморщенные темноокрашенные пикнотические ядра, которые в конечном итоге подвергаются кариорексису. Отмечается разная степень гомогенизации ядра и цитоплазмы [24]. Именно с последней связывают потенциальную необратимость дегенеративных изменений [6, 32].

Нейропил, прилегающий к дегенерирующим нейронам, может быть мелко вакуолизирован в результате набухания нейрональных отростков, также может наблюдаться вакуолизация цитоплазмы нейронов. Кроме того, ДТН, в отличие от АТН, обычно находятся на разных стадиях дегенерации. Например, некоторые из них имеют неизменное ядро, но выраженную эозинофильную цитоплазму, тогда как другие имеют пикнотические или фрагментированные ядра. В зоне дегенеративного изменения нейронов увеличивается содержание астроцитов и микроглиоцитов [24].

Сложность оценки причин возникновения всех типов ТН обусловлена тем, что иницирующие процессы их формирования многообразны – различные патобиохимические каскады или мгновенные физические повреждения, например, ишемия или травма головы (прижизненные, до и в процессе фиксации альдегидами после процедуры вывода животных из эксперимента). Во всех случаях последующее их образование связано с обратимым одноступенчатым фазовым переходом конформационного состояния белков цитозоля и цитоскелета в живой клетке, необратимой фиксацией этого состояния белковой сети альдегидами и ее визуализацией красителями [23].

Конформационный переход трудно предотвратить: он занимает 30–60 сек и сопровождается выделением относительно большого количества свободной воды. Она сливается в систему лакун, а затем проникает через поры и межклеточные каналы в астроциты. Чем больше воды выделяется, тем плотнее становится нейрон и увеличивается вероятность необратимого исхода [23].

Таким образом, образование ТН является быстрым обратимым динамичным и самораспространяющимся ответом нервной ткани на переходные изменения во внеклеточной физико-химической среде любой этиологии. После слабых и умеренных воздействий большая часть ТН не имеет признаков необратимых дегенеративных изменений. То есть, появление ТН, например, в раннем постишемическом периоде не сопровождается впоследствии их полным разрушением и утилизацией. Связь между возникновением ТН и любым функциональным нарушением или когнитивным дефицитом требует дальнейшего изучения [15].

Сколько обратимо измененных ДТН в сенсомоторной коре (СМК) головного мозга можно «спасти» после 40-минутной ООСА неизвестно. Не изучены также особенности нейроглиальной реакции на формирование ДТН при использовании данной модели. Однако, четко установлено, что полная и неполная ишемия, ее продолжительность и количество эпизодов, влияют на содержание ДТН и исход восстановления нервной ткани. Полная ишемия вызывает крупноочаговые необратимые некробиотические изменения с вовлечением в процесс воспаления, неполная – диффузно-очаговые изменения, часто обратимые дистрофические без мощной активации провоспалительных цитокинов и микроглии [7, 8, 9, 13, 14, 20]. Необходимо дальнейшее изучение феномена образования ДТН в СМК головного мозга животных, в частности, перенесших 40-минутную ООСА. Это связано с тем, что данная модель соответствует большей части клинических случаев ишемии – слабым и умеренным повреждениям головного мозга. Кроме того, необходимо оценить риск формирования АТН при иммерсионном и перфузионном способах фиксации головного мозга в эксперименте для исключения неверной интерпретации результатов морфологического исследования.

Материал и методы исследования

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическими комитетами вуза (протокол № 107 от 2 октября 2018 года). Использовали аутбредных половозрелых крыс стока Wistar (самцы массой 270–350 г). Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, эксперимент проводили в соответствии с 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».

40-минутную острую неполную транзиторную ишемию головного мозга моделировали путем окклюзии общих сонных артерий (ООСА) без гипотонии. Выбор этой модели был обусловлен тем, что, в отличие от фокальной полной ишемии (например, окклюзии средней мозговой артерии), данная модель не приводила к крупноочаговым некротическим изменениям [8, 9, 20]. Эксперимент проводили под наркозом Zoletil 100 (5–7 единиц). Через 1, 3 и 7 сут после ООСА (n=18, по 6 крыс на каждый срок) сосудистое русло мозга промывали введением 100–125 мл раствора 0.9% NaCl и Фрагмина (5000 единиц) в левый желудочек сердца и фиксировали перфузией 30 мл 4% раствора параформальдегида на

фосфатном буфере (pH 7.2–7.4). Подобный подход широко используется при взятии материала [1, 18]. Контролем служили интактные крысы (n=12). Головной мозг одной подгруппы контрольных животных (n=6) фиксировали с помощью перфузии, а второй подгруппы (n=6) – иммерсионным способом в аналогичном забуференном фиксаторе. Полученный материал заключали (автомат «STP 120») в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы толщиной 4 мкм готовили (микротом HM 450; Thermo) на уровне сенсомоторной коры [36]. Манипуляции, связанные со взятием материала, проводили под наркозом Zoletil 100.

Идентификацию клеток (пирамидные нейроны/глия) СМК проводили на светооптических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, по Нисслю, а также при иммуногистохимическом типировании NSE, HSP-70, MAP-2 (нейроны), GFAP (астроциты) и AIF-1 (микроглия). При этом HSP-70 использовали для оценки стрессовой реакции темных нейронов на ишемию. Косвенно его активность свидетельствовала о степени устойчивости этих нейронов к гипоксии. Численную плотность пирамидных нейронов, астроцитов и олигодендроцитов определяли при окраске по Нисслю, а микроглиоцитов – с помощью типирования AIF-1. Состояние цитоскелета нейронов (тела и дендриты) изучали с помощью специфических реакций на MAP-2 микротрубочек, а цитоскелета астроцитов – на GFAP промежуточных филаментов. Распределение синаптических терминалей вокруг нейронов изучали с помощью реакции на синаптофизин (p38) и каспазу-3 (CASP3). CASP3, являясь плейотропным ферментом, принимает активное участие не только в реализации апоптоза (перикарион), но и в процессе синаптической пластичности (локализуется в синаптических терминалях) [1, 14]. Микроглиоциты верифицировали с помощью специфической для этих клеток реакции на AIF-1 (воспалительный фактор аллотрансплантата-1), также известный как ионизирующая кальций-связывающая адаптерная молекула 1 (IBA1).

Для иммуногистохимического исследования использовали поли- и моноклональные антитела. NSE (PAA537Ra01), HSP-70 (PABo62Ra01) – кроличьи поликлональные антитела к крысиному антигену; разведение 5–20 мкг/мл (Cloud-Clone Corp.). MAP-2 (ab32454) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (Abcam, США). GFAP (PA0026) – мышинные моноклональные антитела, клон GA5, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). p38 (синаптофизин, PA0299) – мышинные моноклональные антитела, клон 27G12, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary

Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). CASP3 (Mob 309) – мышинные моноклональные антитела, клон 3CSP03, разведение 1:25 (Diagnostic BioSystems Inc., США). AIF-1 (PAC288Ra01) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 5–20 мкг/мл (Cloud-Clone Corp.). Иммуногистохимическую реакцию проводили на срезах, помещенных на полилизиновые предметные стекла. После реакции с первичными антителами срезы инкубировали с соответствующими вторичными антителами, хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидином), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол. Для визуализации использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

Для подсчета численной плотности клеток у каждого животного использовали по пять периодических окрашенных по Нисслю фронтальных среза СМК. Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (объектив $\times 10$, 40, 100, камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size $1.4 \times 1.4 \mu\text{m}$), изображение сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей). Проводили стандартную коррекцию с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость) в Photoshop CC. Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.53 e. Для формирования вариационных рядов использовали случайным образом отобранные цветные изображения неокортекса – 8–10 областей интересов с каждого среза. Формирование окончательных выборок (рандомизация) полей зрения для каждого срока (n=25, на срок) проводили из полученных массивов данных с помощью генератора случайных чисел в программе Statistica 8.0. Таким образом, для морфометрического анализа на срок отбирали по 25 случайно выбранных полей зрения (область интереса) СМК. Такой подход позволил максимально полно отразить разброс изученных количественных переменных. Общую численную плотность пирамидных нейронов, астроцитов и олигодендроцитов в СМК определяли при окраске по Нисслю, гематоксилин–эозин использовали для оценки степени эозинофилии и характера тинкториальных изменений (красные нейроны). При этом численную плотность нейронов рассчитывали по наличию ядрышек на срезах перикарионов в пересчете на 1 мм^2 . Ядрышко являлось чрезвычайно устойчивой структурой нейрона, а его размеры и форма не изменялись даже в клетках с явными ультраструктурными признаками ишемического повреждения ядра и цитоплазмы [10]. На препаратах, окрашенных по Нисслю и гематоксилином–эозином, определяли содержание (в %)

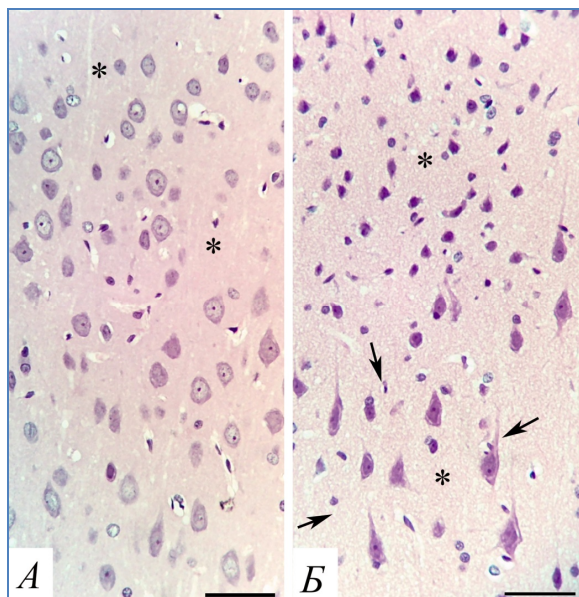


Рис. 1. Сенсомоторная кора головного мозга (слой II–III; контроль): равномерное распределение мономорфных нормохромных (А – фиксация перфузией) и темных артефактных нейронов (Б – иммерсионная фиксация). Стрелки – темные нейроны, * – нейропил. Окраска: гематоксилином и эозином. Об. 40; масштабный отрезок – 50 мкм.

нормо- и гиперхромных нейронов (темных несморщенных и пикноморфных). Для морфометрического анализа также использовали иммуногистохимическую реакцию на AIF-1 (численная плотность микроглиоцитов) и GFAP (численная плотность астроцитов). Олигодендроциты определяли на препаратах, окрашенных по Нислю. Все остальные реакции (NSE, HSP-70, MAP-2, p38, CASP3) применяли для идентификации соответствующих структур по специфическим белкам.

Для выявления зон отека–набухания (максимальная яркость пикселей – Maxima) нервной ткани использовали плагин-фильтр "Find Maxima" M.Schmid из программы ImageJ 1.53 e (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). На каждый срок использовали по 50 случайно выбранных полей зрения (область интереса) цветных изображений площадью 19600 мкм² (объектив ×100). На полученных масках изображений определяли ("Analyze Particles") относительную площадь зон максимальной яркости. Неравномерность распределения зон максимальной яркости оценивали с помощью алгоритма водораздела "Segmented Particles", примененного к значениям яркости изображения, использовали режим "Maxima Within Tolerance". Заданные значения во всех случаях были стандартными и не влияли на результат сравнения.

По литературным данным, для получения достоверных результатов в ходе морфологического исследования достаточно 6–8 животных в группе, 5–6 серийных срезов и 5–10 случайных полей зрения СМК (зоны интере-

са) на каждом срезе [24, 25]. В настоящем исследовании мы сравнивали по 25 рандомизированных полей зрения на каждый срок.

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями, так как для применения параметрических методов вариационные ряды не соответствовали некоторым условиям (небольшие группы, распределение отличалось от нормального). Первоначально использовали критерий для множественного сравнения (ANOVA Kraskel–Wallis). При получении статистически значимого результата проводили парное сравнение с помощью Mann–Whitney U Test для независимых выборок. Использовались также критерий χ^2 и Фишера. Количественные данные в исследовании представлены как медиана (Me – 50% квартиль) и интерквартильный разброс (Q1–Q3 – 25–75% квартили), а также как доли и проценты. Нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0.05$. Анализ проведен с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft) [4].

Результаты и их обсуждение

Необходимо учитывать, что причиной образования темных нейронов является множество физико-химических факторов [23]. По нашим данным, минимальное содержание АТН в сенсомоторной коре головного мозга контрольных белых крыс отмечалось при соблюдении следующей схемы взятия материала: 1) адекватный наркоз, 2) быстрый доступ для транскардиальной перфузии, 3) перфузия физиологическим раствором, 4) последующая перфузия 4% забуференным раствором параформальдегида, 5) бережное вскрытие и мягкое извлечение фиксированного головного мозга, 6) дофиксация в течение 12 ч в аналогичном растворе. Эта схема – результат суммирования рекомендаций для работы с гистологическим материалом [18, 35]. Несоблюдение пункта №4 этих правил (замена перфузии иммерсией) приводило к появлению полей (разной формы и размеров) равномерно распределенных мономорфных АТН (рис. 1А, Б).

При перфузионной фиксации на фоне неизмененного нейропила преобладали типичные нормохромные нейроны с круглым светлым ядром, содержащим узкий ободок базофильного вещества и крупное ядрышко. Цитоплазма таких нейронов имела бледно-розовое окрашивание (слабая эозинофилия). АТН практически не выявлялись (рис. 2).

Для АТН, образовавшихся при иммерсионной фиксации, было характерно уменьшение в 1.57 (1.52–1.65) раза (критерий Манна–Уитни; $p = 0.001$) площади сечения перикариона, его деформация, изменение формы ядра, значительное увеличение степени эозинофилии ядра и цитоплазмы; при этом сохранялись контуры ядра и ядрышка, их базофильные элементы (рис. 2). При иммерсион-

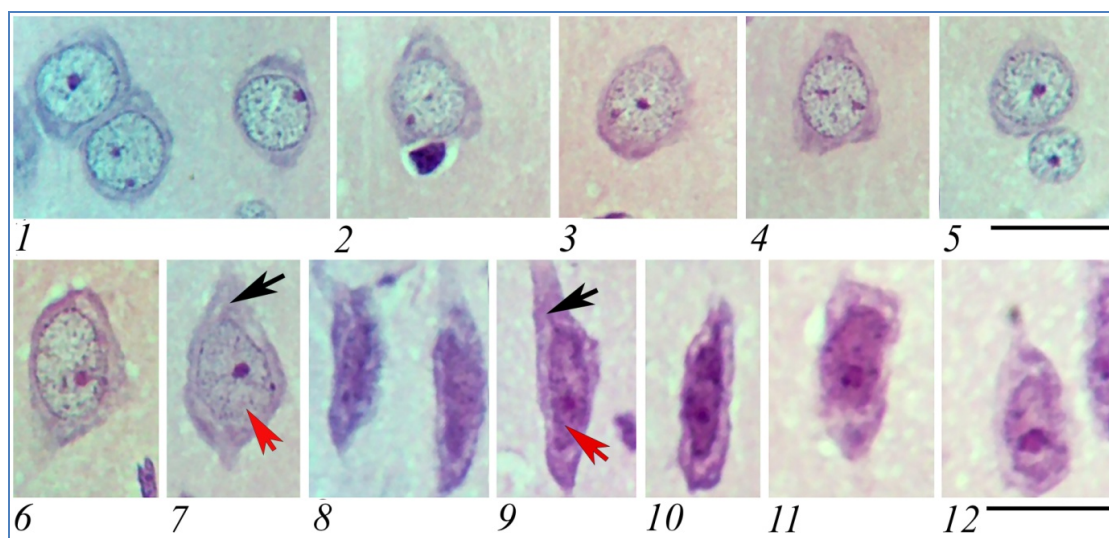


Рис. 2. Пирамидные нейроны сенсомоторной коры головного мозга (слои III и V; контроль) при перфузионной (1–7) и иммерсионной (8–12) фиксации: нормохромные (1–7) и артефактные темные (8–12) нейроны. Черные стрелки – цитоплазма, красные стрелки – ядра. Окраска: гематоксилином и эозином. Об. 100; масштабный отрезок – 20 мкм.

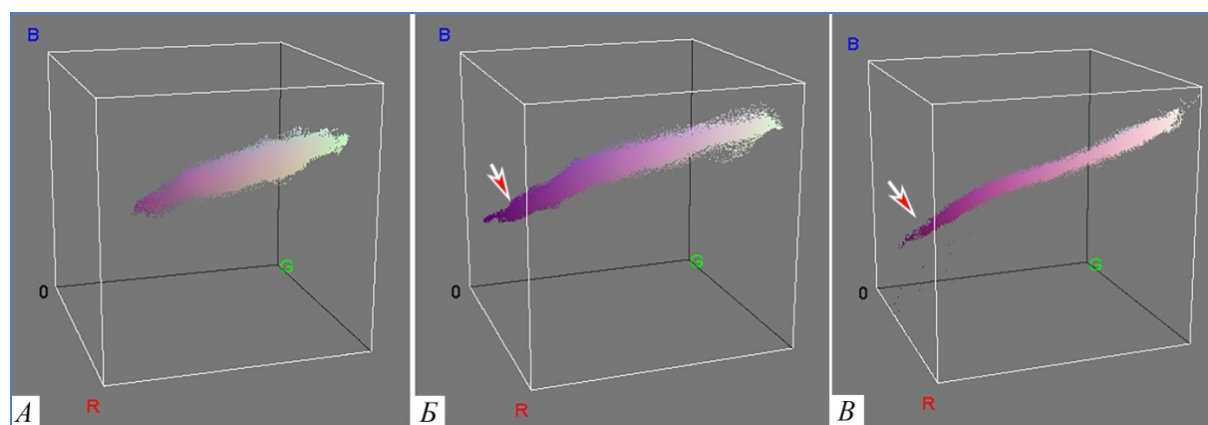


Рис. 3. Пространственное распределение пикселей цветных (RGB) изображений нормохромных (А), артефактных (Б) и прижизненно дегенеративно измененных (В) пирамидных нейронов СМК головного мозга (слой V) при перфузионной (А, В) и иммерсионной (Б) фиксации: артефактные и дегенеративно измененные темные нейроны имеют выраженное красное смещение (стрелка). Окраска: гематоксилин-эозином. Об. 100.

ной фиксации из 25 случайных полей зрения СМК контрольных животных в 17 были выявлены поля АТН, а при перфузионной фиксации – только в 6 ($\chi^2=8.1$; $p=0.01$).

Очень редко (1–2 в поле зрения) после перфузионной и иммерсионной фиксации в СМК контрольных животных встречались АТН с признаками выраженной дегидратации, грубым сморщиванием перикариона, штопорообразным дендритом, кариорексисом. По данным литературы, такие АТН в мозге интактных животных образуются только при очень грубом механическом воздействии на биологические пробы до фиксации [27].

Изучение пиксельного состава цветных изображений (плагин Color inspector 3D, ImageJ 1.53 e) нормохромных нейронов, АТН и ДТН показало, что между ними существовало графическое пространственное различие. Для АТН и ДТН было характерно выраженное красное смещение (рис. 3А, Б, В). При этом АТН и ДТН имели схожее распределение пикселей (рис. 3Б, В). Однако, у ДТН отмечено уменьшение количества синих пикселей в 3D пространстве. Вероятно, что это связано с частичным разрушением базофильного вещества в некоторых ДТН.

Таким образом, некоторые АТН по морфологии и тинкториальным свойствам похожи на ДТН, и могли повлиять на результаты их верификации. Вполне вероятно, что артефактные изменения накладывались на прижизненные проявления нейродегенерации и усиливали их, изменяя степень дегидратации клеточного матрикса. Поэтому для более точного морфометрического анализа ДТН в постишемическом периоде целесообразно использовать перфузионный метод фиксации головного мозга, который существенно снижал вероятность образования АТН при условии бережного обращения с пробами.

Через 1, 3 и 7 сут после 40-мин ООСА выявлялось большое количество темных нейронов, которые, по морфологическим призна-

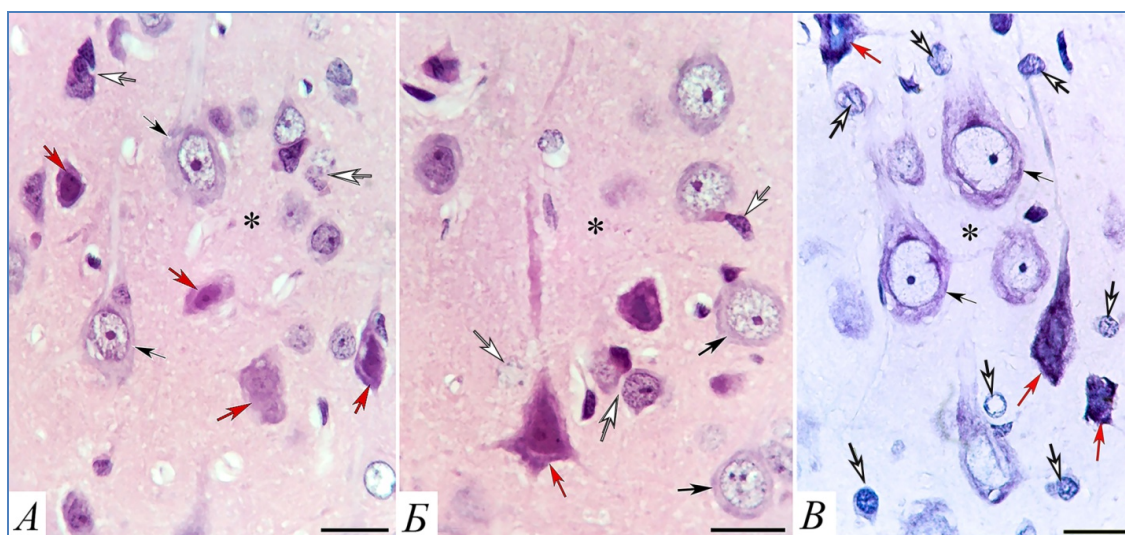


Рис. 4. Пирамидные нейроны слоя V СМК головного мозга через 1 (А, Б) и 7 сут (В) после ООСА: высокая плотность изображения ДТН, гетероморфность нормохромных (черные стрелки) и ДТН (красные стрелки), большое количество глиальных клеток (белые стрелки). Окраска: гематоксилином и эозином (А, Б), по Нислю (В). Об. 100; масштабный отрезок – 20 мкм.

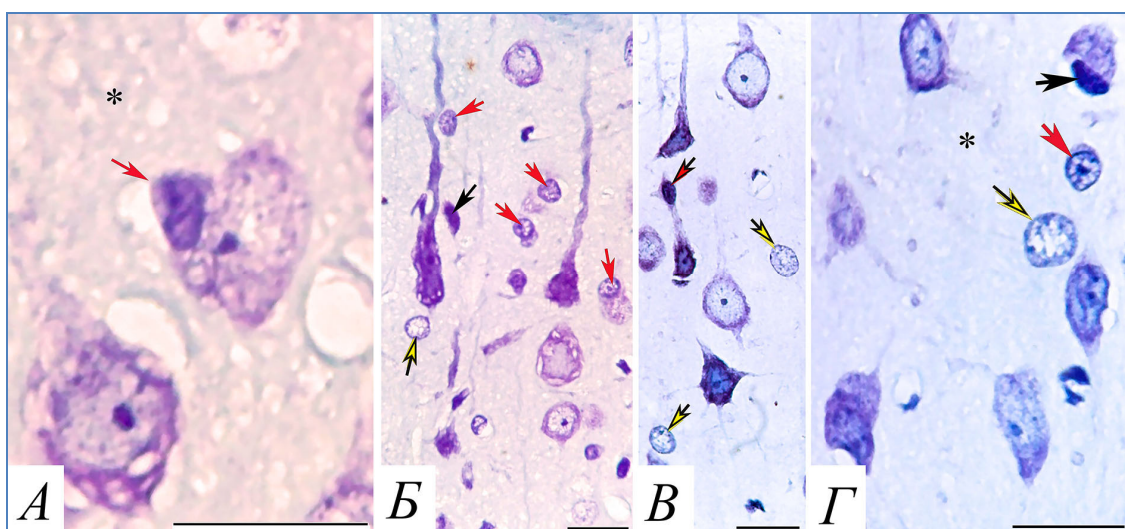


Рис. 5. Пирамидные нейроны слоя III СМК головного мозга через 3 (А, Б) и 7 сут (В, Г) после ООСА: вакуолизация перикарионов и нейрофила (А, Б), разные стадии дегенерации соседних темных нейронов (Б, В), высокое содержание астроцитов (желтые стрелки), микроглиоцитов (черные стрелки) и олигодендроцитов (красные стрелки). * – нейрофил. Окраска: гематоксилином и эозином (А, Б), по Нислю (В, Г). Об. 100; масштабный отрезок – 20 мкм.

кам, можно было отнести к ДТН (рис. 4А, Б, В). Преобладали обратимо измененные ДТН без грубой деструкции ядра и цитоплазмы, с сохраненным ядрышком, умеренным уменьшением объема перикариона.

Необратимая прижизненная дегенерация нейронов, которая в литературе при окраске гематоксилином и эозином описывается как «острая эозинофильная дегенерация нейронов», «красные мертвые нейроны», «пикноморфные нейроны» [11] после 40-минутной ООСА проявлялась выраженным уменьшением объема перикариона, интенсивной эозинофилией ядра и цитоплазмы, утратой базофильного вещества, появлением нейронов с мелкими сморщенными темноокрашенными пикнотическими ядрами, исчезновением контуров ядра (рис. 4А, Б, В). Для

некоторых таких ДТН была характерна гомогенизация ядра и цитоплазмы (рис. 4В).

После ООСА в СМК отмечали признаки вакуолизации перикарионов ДТН, дендритов и отростков астроглии нейропиля (рис. 5А, Б).

У контрольных животных выявлена низкая степень гидратации нервной ткани СМК – относительная площадь зон отека-набухания составила 5.4% (2.8–7.9) поля зрения. Через 1 сут после ООСА этот показатель увеличился до 17.6% (11.5–18.7) (Mann–Whitney U Test, $p=0.0001$), через 3 сут очаги отека-набухания охватывали 13.4% (9.4–15.2), через 7 сут – 13.2% (11.5–17.2) СМК, статистически значимо отличались от контроля (Mann–Whitney U Test, $p=0.001$). Отмечалась значительная гетероморфность гидропических изменений в нейропиле, вокруг

Таблица 1

Содержание (доля) темных нейронов с ядрышками в слое III и V СМК в норме и постишемическом периоде

Подгруппы	Слой СМК	
	III	V
Контроль	5/200	4/200 $p=0.92^{\text{III-V}}$
1-е сут	18/200 $p=0.01^*$	24/200 $p=0.0001^*$ $\chi^2=0.67$; $df=1$; $p=0.42^{\text{III-V}}$
3-е сут	40/200 $p<0.0001^*$ $\chi^2=8.9$; $df=1$; $p=0.003^{\text{II}}$	92/200 $p<0.0001^*$ $\chi^2=54.5$; $df=1$; $p<0.0001^{\text{II}}$ $\chi^2=29.4$; $df=1$; $p<0.0001^{\text{III-V}}$
7-е сут	36/200 $p<0.0001^*$ $\chi^2=0.15$; $df=1$; $p=0.70^{\text{II}}$	106/200 $p<0.0001^*$ $\chi^2=1.7$; $df=1$; $p=0.19^{\text{II}}$ $\chi^2=51.9$; $df=1$; $p<0.0001^{\text{III-V}}$
Множественное сравнение всех сроков (1–3–7 суток)	$\chi^2=10.4$; $df=2$; $p=0.01$	$\chi^2=82.5$; $df=2$; $p<0.0001$

Примечание: * – сравнение с контролем (критерий Фишера), II – предыдущим сроком, III-V – между слоями (критерий χ^2); в каждом сроке оценивали по 200 нейронов.

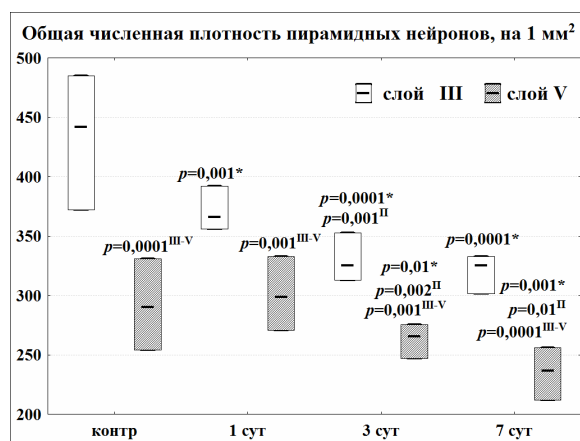


Рис. 6. Общая численная плотность (на 1 мм²) пирамидных нейронов в СМК (слои III, V) белых крыс в норме и после ООСА. Обозначения: * – сравнение с контролем, II – с предыдущим сроком, III-V – между слоями (Mann-Whitney U Test). Различия статистически значимы при $p<0.05$. Материал представлен как медиана и межквартильный размах.

нейронов и сосудов. Основной объем зон отека-набухания связан с нейропилем (дендриты, синапсы, отростки астроцитов) и микрососудами (отростки астроцитов). Только для единичных, как правило, пикноморфных ДТН отмечены проявления перичеселлюлярного отека. Соседние ДТН, в отличие от АТН, обычно находились на разных стадиях дегенерации.

Таким образом, после 40-минутной ООСА ДТН имели разную степень дегидратации перикариона, деструкции его элементов, гидропической дистрофии (рис. 4 Б, В). Как правило, в зоне дегенеративного изменения нейронов увеличивалось содержание астроцитов, микроглиоцитов и олигодендроцитов (рис. 4).

Общая численная плотность пирамидных нейронов (срез через центр ядра, с види-

мым ядрышком) в слое III контрольных животных была больше, чем в слое V. Установили, что после ООСА для слоя III ($H=22.4$; $df=2$; $p=0.001$) и слоя V ($H=15.2$; $df=2$; $p=0.004$) между сроками (1–3–7-е сут) существовали статистически значимые различия по данному показателю (ANOVA Kruskal–Wallis). Через 7 сут в слое III (по сравнению с контролем) его значение уменьшалось на 26.4% ($p=0.001$), а в слое V – на 18.5% (Mann–Whitney U Test; $p=0.01$). Вариационные ряды имели большой интерквартильный разброс, что свидетельствовало об очаговой гетерогенности процесса повреждения и элиминации нейронов (рис. 6).

Максимально высокое содержание ДТН отмечали через 3 и 7 сут после ООСА в слое V (табл. 1). При этом доля пикноморфных нейронов в остром периоде (через 1–3 сут) в слое III составила 8/200, слой V – 13/200, а через 7 сут была больше, чем в остром периоде – 19/200 ($\chi^2=3.9$; $df=1$; $p=0.046$) и 28/200 ($\chi^2=5.3$; $df=1$; $p=0.021$) соответственно. 40-минутная ООСА, являясь моделью неполной ишемии головного мозга средней степени тяжести, по морфологическим изменениям СМК соответствовала зоне пенумбры [35].

Таким образом, необратимая деструкция нейронов после 40-минутной ООСА имела диффузно-очаговый характер, проявлялась более выраженным дефицитом общей численной плотности нейронов в слое III СМК. Вероятно, что после ишемии быстрее погибали мелкие пирамидные нейроны слоя III, а крупные пикноморфные нейроны слоя V накапливались и утилизировались в более отдаленном периоде. Мы предполагаем, это обусловлено тем, что для фагоцитоза мелкого поврежденного нейрона, согласно литературным данным, достаточно одного МГЦ [22], а крупный нейрон утилизируется по частям и

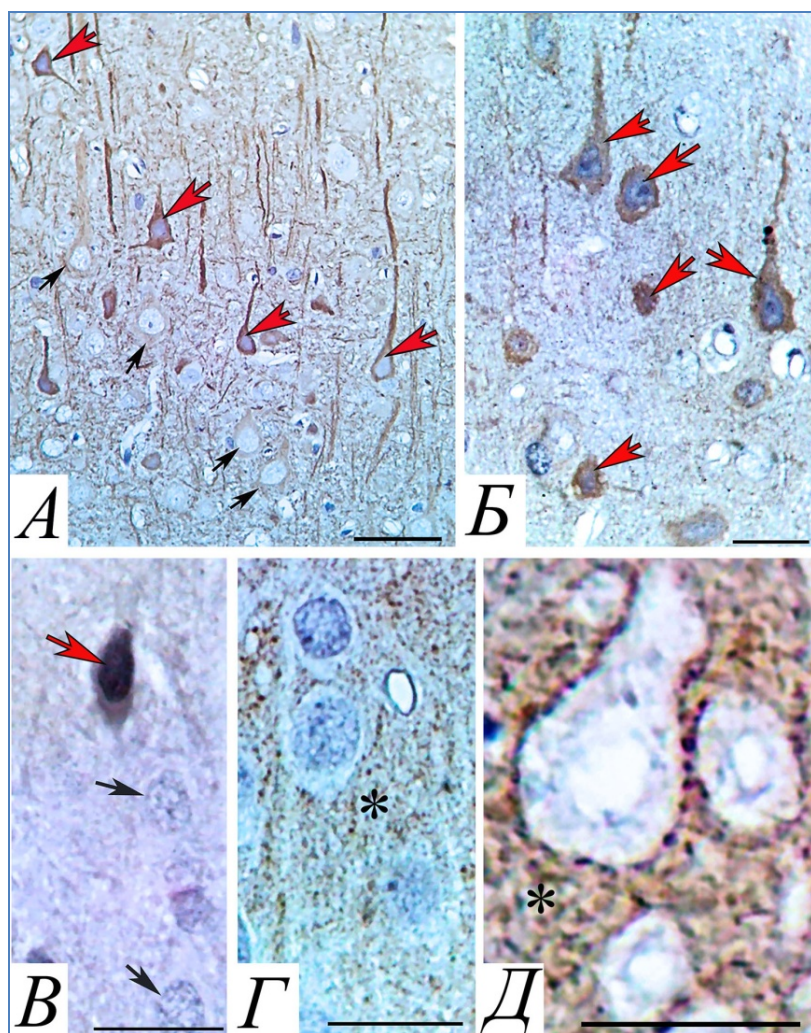


Рис. 7. Темные нейроны при реакции на специфические нейрональные белки: сохранность и высокая плотность типичных белков. Обозначения: А – MAP-2 (1-е сут), Б – NSE (1-е сут), В – HSP-70 (7-е сут), Г – CASP3 (3-е сут), Д – p38 (3-е сут); * – нейрониль. Окраска: иммуногистохимия. Об. 40 (А) 100 (Б–Д); масштабный отрезок – 50 мкм (А) и 20 мкм (Б–Д).

этот процесс занимает более длительное время.

При иммуногистохимическом исследовании СМК установили, что после 40-минутной ООСА в ДТН увеличивалась плотность распределения маркеров NSE, HSP-70 и MAP-2 (рис. 7А, Б, В). На поверхности ДТН и в нейропиле выявлены p38- и CASP3-позитивные структуры – синаптические терминалы. При этом в перикарионах маркер апоптоза CASP3 отмечен лишь в единичных нейронах (рис. 7Г, Д). Все это свидетельствовало о сохранности специфических белков большей части ДТН, а значит и их цитоскелета, структур системы коммуникации, обеспечивающих функционирование нейронных сетей [11, 35]. Кроме того, распределение CASP3 преимущественно в синаптических терминалах свидетельствовало о реализации ее нейропластических потенций, как плейотропного фермента [1, 14]. Высокую плотность NSE и HSP-70 в ДТН можно рассматривать как адаптивный ответ на стрессовое ишемическое воздействие [28].

Описанные выше структурные изменения ДТН сопровождалась реорганизацией нейроглиальной архитектоники СМК. Изменялась популяция астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов (рис. 8А, Б, В).

Так, в контроле нейроглиальный (астроциты) индекс составил 1.62 (1.53–1.81), а через 3 сут после ООСА увеличивался до 2.72 (2.48–3.10) (медиана; Mann–Whitney U Test; $p=0.001$). Вместе с тем отмечалась гипертрофия отростков астроцитов (рис. 8А).

В СМК контрольных животных преобладали мелкие размером 21.2 (30.8–42.6) мкм² неактивные микроглиоциты с овальным ядром (5×7.5 мкм) и тонкими отростками, которые выявлялись в составе глиомикроваскулярных комплексов, свободно в нейропиле, а также в тесном контакте с перикарионами без и в сочетании с ОДЦ. В постшемическом периоде размеры МГЦ увеличивались до 42.6 (31.3–51.0) мкм² (Mann–Whitney U Test, $p=0.0001$). На этом уровне показатели оставались через 3 и 7 сут. Подобные изменения являются проявлением нейровоспаления и формирования крупных амебоидных МГЦ (рис. 8Б), для которых характерны большие размеры, неправильная форма тела, преобладание фагоцитарной функции и секреции цитокинов [2].

При множественном сравнении установили, что после ООСА для МГЦ ($N=11.5$; $p=0.003$) и ОДЦ ($N=9.2$; $p=0.01$) между сроками (1–3–7-е сут) существовали статистически значимые различия (ANOVA

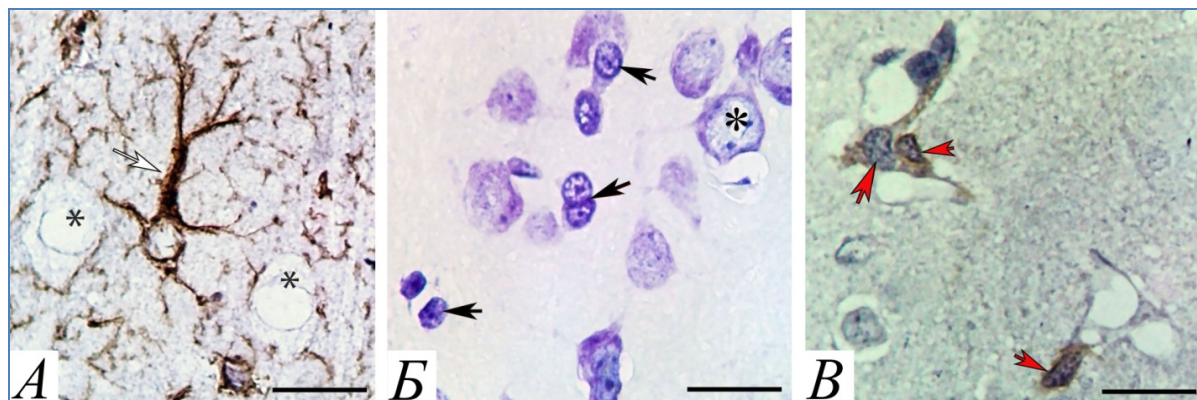


Рис. 8. Астроциты (А), олигодендроциты (Б) и микроглия (Б) слоя V СМК головного мозга через 1 (Б), 3 (А) и 7 сут (Б) после ООСА: гипертрофия астроцита (белая стрелка), высокая плотность олигодендроцитов (черные стрелки) и микроглии (красные стрелки); * – нейроны. Окраска: реакция на GFAP (А), по Нисслю (Б), реакция на AIF-1 (Б). Об. 100; масштабный отрезок – 20 мкм.

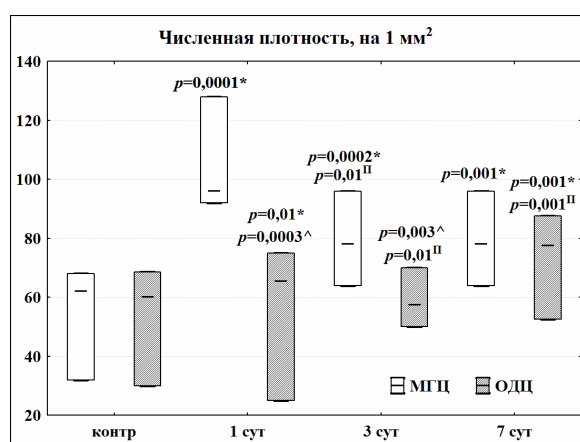


Рис. 9. Общая численная плотность (на 1 мм²) всех типов микроглии и олигодендроцитов в СМК (слои III + V) белых крыс в норме и после ООСА. Обозначения: * – сравнение с контролем, ^ – с предыдущим сроком, ^ – между микроглией и олигодендроцитами (Mann-Whitney U Test). Различия статистически значимы при $p < 0.05$. Материал представлен как медиана и межквартильный размах. МГЦ – микроглия, ОДЦ – олигодендроциты.

Kruskal–Wallis). Сравнение динамики изменения количества МГЦ и ОДЦ в СМК показало, что пик увеличения плотности этих клеток после ООСА отличался: для МГЦ – через 1 сут, ОДЦ – 7 сут (рис. 9).

После ООСА возрастала доля активных форм (крупных амебоидных без длинных отростков, неправильной формы) микроглиальных клеток (от 15% в контроле до 65% через 1 сут; Mann–Whitney U Test, $p = 0.0001$). Мы предполагаем, что в остром постишемическом периоде МГЦ санировали нервную ткань, обеспечивая ее последующее структурно-функциональное восстановление с участием ОДЦ.

Таким образом, в постишемическом периоде (через 1, 3 и 7 сут после 40-минутной ООСА) в слоях III и V были выявлены темные нейроны, цитоморфологические характеристики которых свидетельствовали о наличии

динамики прижизненных дегенеративных изменений (ДТН) и нейроглиальной реакции на их появление. По данным литературы, АТН, в отличие от ДТН, не имели структурных признаков длительных «исторических процессов» – они появлялись, но не изменялись [23, 24]. ДТН после инициации острой ишемией (снижение содержания АТФ, уровня pH) конформационных изменений цитоматрикса проходили сложный длительный путь конкуренции деструктивных и компенсаторно-восстановительных процессов, в результате чего одни нейроны восстанавливались до нормохромных, другие – подвергались дегидратации, погибали и фагоцитировались нейроглией (альянс астроцитов и микроглии). Кроме того, необходимо учитывать фактор образования ДТН в результате вторичных нарушений микроциркуляции и нейровоспаления в течение изученного постишемического периода (1–7-е сут). Восстановление ДТН сопровождалось/обеспечивалось увеличением количества сателлитарных олигодендроцитов, которое максимально регистрировали через 7 сут после ООСА.

Биологическое значение, роль и механизмы образования «темных нейронов» продолжают изучаться. До сих пор нет общепризнанной теории этого процесса. Все обсуждения проходят на уровне гипотез, которые сложно доказать. Кроме того, нет специфических способов выявления именно темных нейронов [15, 24, 30].

Вероятно, в основе их формирования лежит потеря клеткой воды. Быстрое и массивное выделение жидкости не может быть объяснено каким-либо ферментативным мембранным насосным механизмом или осмотическими градиентами. Скорее всего, это связано с неферментативным (физико-химическим) явлением – фазовым переходом гелевой белковой сети цитоплазмы и изменением нековалентных взаимодействий. Подобные изменения белков могут быть иницииро-

ваны фиксацией альдегидами, последующим взятием материала, температурным режимом хранения материала и другими физическими факторами, не имеющими отношения к прижизненным ишемическим химическим механизмам. Иницируемый либо химическим, либо физическим триггером в одной внутриклеточной точке фазовый ступенчатый переход гель–гель распространяется на группу клеток по принципу домино и на одном из этапов уплотняет, за счет потери выделившейся воды, ультраструктурные компоненты геля (длинные молекулы белков), что приводит к тинкториальным изменениям при последующей гистологической окраске [23].

Особое значение правильная идентификация реально патологически измененного нейрона и артефакта «темный нейрон» имеет при проведении морфометрической оценки популяции нейронов. Часто происходит переоценка (гипердиагностика) степени повреждения ткани по количеству гиперхромных нейронов за счет АТН, которые не являются прижизненно дегенеративно измененными клетками [24, 39].

Есть данные о снижении иммунореактивности специфических белков в АТН (Cav3), а также в астроцитах (GFAP) и, в существенно меньшей степени, микроглиоцитах (AIF-1) при иммерсионной фиксации. Авторы объясняют это артефактом, связанным с возникновением полей темных нейронов при взятии материала (физическим сдавливанием ткани) [39]. В нашем исследовании при перфузионной фиксации подобных изменений не выявлено. Это свидетельствует о соблюдении всех стандартов правильного взятия материала и возможности проведения адекватной морфометрии.

Для предотвращения возникновения АТН требуется перфузионная и последующая дополнительная иммерсионная фиксация головного мозга, бережное обращение с фиксированной тканью и использование стандартных протоколов приготовления препаратов. Несоблюдение этих правил значительно увеличивает вероятность образования АТН при взятии как контрольного, так и экспериментального материала. Результатом может быть неправильная трактовка влияния ишемии на нервную ткань головного мозга [18, 24, 39].

С помощью специальных флуоресцентных окрасок (например, Fluoro-Jade C), иммуногистохимической реакции к phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase (pERK) и NeuN установлено, что среди образовавшихся при ишемии темных нейронов значительная часть 50–100% является необратимо измененными. Их доля зависит от отдела мозга и модели ишемии или гипоксии. То есть доказано, что ишемия реально приводит к прижизненному образованию и гибели ДТН [35, 38]. Аналогичные результаты полу-

чены при моделировании эпилепсии [19]. Однако, самый главный вывод из этих экспериментов заключается в том, что не все ДТН после ишемии погибают и этим процессом можно управлять [16, 33]. Согласно H.Ooigawa et al. [35], после перкуссионной травмы головного мозга значительная часть ДТН в неокортексе восстанавливалась до нормохромных, а в гиппокампе – погибала. То есть, возможность дальнейшей трансформации ДТН зависит еще и от отдела мозга.

Формирование ДТН после 40-минутной ООСА, вероятно, представляет собой раннюю стадию острой реакции нейронов в ответ на потерю АТФ и высвобождение глутамата, сопровождается умеренной дегидратацией цитоплазмы. По данным литературы, после восстановления кровотока большая часть таких нейронов восстанавливается до нормохромных, остальные, вероятно, переходят в необратимую стадию повреждения (апоптоз, некробиоз) [15, 29, 30]. В последнее время отмечено большое внимание к изучению обратимых процессов и гиперхромных нейронов с нормальной жизнеспособностью не только при ишемии, но и, например, при эпилептизации мозга. Авторы рассматривают выявленные ими морфофункциональные корреляты обратимых изменений в гиппокампе в качестве индикаторов функционального состояния и для оценки эффекта противосудорожных препаратов [5].

По нашим данным, уплотнение нейрофиламентов цитоматрикса (MAP-2) после 40-минутной ООСА не приводит к гибели нейронов (не является ее причиной). Несомненно, что в ответ на нарушения микроциркуляции, энергетического, водного и ионного обмена происходит ряд последовательных конформационных изменений белков, которые затрагивают и цитоскелет нейронов. В результате блокируются физико-химические основы образования и распространения нервного импульса, а также нейропластические механизмы. Однако, часть таких ДТН восстанавливается. Этому способствует повышение плотности NSE, HSP-70 и активация трофических функций нейроглии. Полное стабильное восстановление всех структур межнейронной коммуникации нейронов в СМК, вероятно, требует значительно большего времени (>7 сут). В пользу этого свидетельствуют и литературные данные [35]. Так, через час после реперфузии в соматодендритных доменах ДТН нейронов наблюдались гипербазофилия, гипераргирофилия, гиперэлектронная плотность и резкое уплотнение ультраструктурных элементов. Через 1 сут степень ультраструктурного уплотнения уменьшилась и в некоторых ДТН появились митохондриальные мембранные кристы, что свидетельствует об их восстановлении. Цитоплазма нейронов, проявляющих апоптотиче-

скую конденсацию ядерного хроматина, проявляла те же морфологические особенности, что и ДТН. Через 1 сут и невосстанавливающиеся ДТН, и апоптотические нейроны распадались на мембраносвязанные компактные электронно-плотные фрагменты, которые впоследствии поглощались фагоцитарными клетками. Кроме того, это свидетельствовало о витальных нейродегенеративных изменениях темных нейронов [15, 29, 30].

Сравнение динамики изменения количества МГЦ и ОДЦ показало, что пик увеличения плотности этих клеток соответствовал 1-м и 7-м сут. Вероятно, в остром постишемическом периоде МГЦ предварительно санируют нервную ткань (1–3-е сут), обеспечивая ее последующее структурно-функциональное восстановление с участием ОДЦ (7-е сут). Кроме того, МГЦ играют большую роль в обеспечении нейропластических процессов в поврежденном мозге [17].

Таким образом, в настоящей статье рассмотрены литературные данные, освещающие морфогенетические механизмы образования «темных нейронов», а также результаты собственного исследования нейронов в норме и после 40-минутной ООСА. Показано, что образование темных нейронов может быть не только следствием ишемии, но и результатом применения иммерсионной фиксации при взятии материала. Поэтому для правильной интерпретации выявляемых «темных нейронов», во избежание неадекватной оценки постишемических нейродегенеративных процессов необходимо использовать перфузионную фиксацию и учитывать состояние всех клеток и нейропиля неокортекса. Целесообразно также применять специальные методы верификации «погибших» нейронов (Fluoro-Jade C, pERK) для более точной оценки жизнеспособности нервной ткани. Это имеет особое значение при морфологическом подтверждении эффектов тестируемых лекарственных препаратов.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование иммерсионной фиксации головного мозга приводило к образованию большого количества артефактных темных нейронов в СМК контрольных животных. Артефактные темные нейроны и темные нейроны, образовавшиеся в результате прижизненных дегенеративных изменений после острой ишемии, имели сходную морфологию и тинкториальные свойства. Также важным признаком артефактных темных нейронов, выявленных у контрольных животных при иммерсионной фиксации, являлся изоморфизм. Такие клетки находились на одной стадии трансформации, которая не сопровождалась реакцией нейроглии и окру-

жающего нейропиля. После 40-минутной окклюзии общей сонной артерии в сенсомоторной коре на фоне проявлений гидропической дистрофии выявлены темные нейроны, цитоморфологические характеристики которых свидетельствовали о наличии динамики прижизненных дегенеративных изменений. Появление дегенеративно измененных темных нейронов сопровождалось увеличением количества астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов. Пик увеличения численности для микроглиоцитов приходился на 1-е сут, олигодендроцитов – на 7-е сут. Большая часть темных нейронов в сенсомоторной коре находилась на стадии обратимого изменения клеток в ответ на умеренное ишемическое воздействие.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов А.С., Горбунова А.В., Степанов С.С. Плейотропные ферменты апоптоза и синаптическая пластичность гиппокампа белых крыс после окклюзии общих сонных артерий. Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. 2018;33(3):102–10 [Avdeev DV, Akulinin VA, Stepanov AS, Gorbunova AV, Stepanov SS. Pleiotropic enzymes of apoptosis and synaptic plasticity in albino rat hippocampus after occlusion of common carotid arteries. The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine. 2018;33(3):102–10] (in Russian). doi:10.29001/2073-8552-2018-33-3-102-110
2. Алексеева О.С., Кирик О.В., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Микроглия головного мозга: происхождение, структура и функции. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2019;55(4):231–41 [Alekseeva OS, Kirik OV, Gilerovich EG, Korzhevskii DE. Microglia of the brain: origin, structure and functions. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2019;55(4):231–41] (in Russian). doi: 10.1134/S0044452919040028
3. Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. Морфологические нарушения нейронов гиппокампа крыс с субтотальной и тотальной ишемией. Оренбургский медицинский вестник. 2020;8(2):41–6 [Bon EI, Maksimovich NE, Zimatkin SM. Morphological disorders in the neurons of the rats hippocampus with subtotal and total ischemia. Orenburg Medical Herald. 2020;8(2):41–6] (in Russian).
4. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере. Санкт-Петербург: Питер. 2003 [Borovikov V. Statistica. Iskustvo analiza dannyh na komp'yutere. Sankt-Peterburg: Piter. 2003] (in Russian).
5. Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Журавин И.А., и др. Морфофункциональные изменения в поле СА1 гиппокампа крыс при использовании пентилентетразоловой и литий-пилокарпиновой моделей судорожных состояний. Журнал

- эволюционной биохимии и физиологии. 2014;50(6):463–69 [Vasil'ev DS, Tumanova NL, Zhuravin IA, et al. Morphofunctional changes in field CA1 of the rat hippocampus after pentylenetetrazole and lithium-pilocarpine induced seizures. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2014;50(6):531–8] (in Russian).
6. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Темные нейроны мозга. Морфология. 2017;152(6):81–6 [Zimatkin SM, Bon' EI. "Dark" brain neurons. *Morphology*. 2017;152(6):81–6] (in Russian).
7. Шертаев М.М., Ибрагимов У.К., Икрамова С.К., и др. Морфологические изменения в тканях головного мозга при экспериментальной ишемии. Вестник НГПУ. 2015;1(23):72–9 [Shertaev MM, Ibragimov UK, Ikramova SK, et al. Morphological changes in brain tissues after experimental ischemia. *Novosibirsk State Pedagogical University Bulletin*. 2015;1(23):72–9] (in Russian) doi: 10.15293/2226-3365.1501.07
8. 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-мин окклюзии общих сонных артерий. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2017(a);103(10): 1135–47 [Stepanov AS, Akulinin VA, Stepanov SS, Avdeev DB. Cellular systems for the recovery and utilization of damaged brain neurons in white rats after a 20-minute occlusion of common carotid arteries. *Russian Journal of Physiology*. 2017;103(10):1135–47] (in Russian).
9. Степанов А.С., Акулинин В.А., Мьщик А.В., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии. Общая реаниматология. 2017(6);13(6): 6–17 [Stepanov AS, Akulinin VA, Mysik AV, Stepanov SS, Avdeev DB. Neuro-Glio-Vascular Complexes of the Brain After Acute Ischemia. *General Reanimatology*. 2017 Jan 1;13(6):6–17] (in Russian). doi: 10.15360/1813-9779-2017-6-6-17
10. Степанов С.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Степанов А.С., Горбунова А.В. Структурно-функциональная реорганизация ядрышкового аппарата нейронов неокортекса, архикортекса и базальных ганглиев головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018;7(4): 67–74 [Stepanov SS, Akulinin VA, Avdeev DB, Stepanov AS, Gorbunova AV. Structural-functional Reorganization of the Nucleolar Apparatus of Neurons of the Neocortex, Archicortex and Basal Ganglia of the Brain of White Rats After a 20-minute Occlusion of the Common Carotid Arteries. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2019 Jan 11;7(4):67–74] (in Russian). doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-4-67-74
11. Степанов С.С., Кошман И.П., Шоронова А.Ю., и др. Структурные основы изменения межнейронной коммуникации нейронов поля СА3 гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2021;65(1): 22–34 [Stepanov SS, Koshman IP, Shoronova AYU, et al. The structural base for changes in the interneuronal communication of ca3 neurons in the hippocampus of white rats after severe traumatic brain injury. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2021;65(1): 22–34] (in Russian).
12. Торшин В.И., Кастыро И.В., Костяева М.Г., и др. Влияние экспериментальной моделирования септопластики на цитоархитектонику гиппокампа у крыс. Голова и шея. 2019;7(4): 33–41 [Torshin VI, Kastyro IV, Kostyaeva MG, et al. The effect of experimental modeling of septoplasty 33–41 on rat hippocampal cytoarchitectonics. *Head and neck*. 2019;7(4): 33–41] (in Russian). doi: 10.25792/HN.2020.8.2.33–38
13. Шляхто Е.В., Баранцевич Е.Р., Шербак Н.С., Галагудза М.М. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 1. Вестник РАМН. 2012; 6: 42–50 [Shlyakhto EV, Barantsevich ER, Shcherbak NS, Galagudza MM. Molecular mechanisms of development of cerebral tolerance to ischemia. Part 1. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2012 Jun 23;67(6):42–50] (in Russian).
14. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Преко кондиционирование клеток мозга к патологическим воздействиям: вовлеченность протеаз (обзор). Биохимия. 2015;80(2): 204–13 [Yakovlev AA, Gulyaeva NV. Possible role of proteases in preconditioning of brain cells to pathological conditions. *Biochemistry (Moscow)*. 2015;80(2): 204–13] (in Russian).
15. Ahmadpour S, Behrad A, Vega IF. Dark Neurons: A protective mechanism or a mode of death. *Journal of Medical Histology*. 2019 Dec 1;3(2):125–31. doi: 10.21608/JMH.2020.40221.1081
16. Alawieh A, Langley EF, Tomlinson S. Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice. *Science Translational Medicine*. 2018 May 16;10(441):eaa06459. doi: 10.1126/scitranslmed.aa06459
17. Bisicchia E, Sasso V, Molinari M, Viscomi MT. Plasticity of microglia in remote regions after focal brain injury. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2019 Oct;94:104–11. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.01.011
18. Bolon B, Garman R, Jensen K, Krinke G, Stuart B. A "Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing—for Today. *Toxicologic Pathology*. 2006 Apr;34(3):296–313. doi: 10.1080/01926230600713269
19. Castro OW, Furtado MA, Tilelli CQ, Fernandes A, Pajolla GP, Garcia-Cairasco N. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Research*. 2011 Feb;1374:43–55. doi: 10.1016/j.brainres.2010.12.012
20. Chen Z, Trapp BD. Microglia and neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*. 2015 Mar 10;136:10–7. doi: 10.1111/jnc.13062
21. Cole JH, Jolly A, de Simoni S, Bourke N, Patel MC, Scott G, et al. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury. *Brain*. 2018 Jan 4;141(3):822–36. doi: 10.1093/brain/awx354
22. Eyo UB, Dailey ME. Microglia: Key Elements in Neural Development, Plasticity, and Pathology. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2013 Jan 27;8(3):494–509. doi: 10.1007/s11481-013-9434-z

23. Gallyas F, Pál J, Bukovics P. Supravital microwave experiments support that the formation of “dark” neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system. *Brain Research*. 2009 May;1270:152–6. doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.020
24. Garman RH. Histology of the Central Nervous System. *Toxicologic Pathology*. 2010 Nov 30;39(1):22–35. doi: 10.1177/0192623310389621
25. Graeber MB, Blakemore WF, Kreutzberg GW. Cellular pathology of the central nervous system. In: Graham DI, Lantos PL. *Greenfield's neuropath*. 1. London. Arnold. 2002.
26. Harris TC, de Rooij R, Kuhl E. The Shrinking Brain: Cerebral Atrophy Following Traumatic Brain Injury. *Annals of Biomedical Engineering*. 2019;47(9):1941–59. doi: 10.1007/s10439-018-02148-2
27. Jortner B. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. *NeuroToxicology*. 2006 Jul;27(4):628–34. doi: 10.1016/j.neuro.2006.03.002
28. Kim JY, Barua S, Huang MY, Park J, Yenari MA, Lee JE. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy for Neuroprotection after Brain Injury. *Cells*. 2020 Sep 2;9(9):2020. doi: 10.3390/cells9092020
29. Belov Kirdajova D, Kriska J, Tureckova J, Anderova M. Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2020 Mar 19;14. doi: 10.3389/fncel.2020.00051
30. Kövesdi E, Pál J, Gallyas F. The fate of “dark” neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: Neurobiological aspects. *Brain Research*. 2007 May;1147:272–83. doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.011
31. Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews*. 1999 Jan 10;79(4):1431–568. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1431
32. Lychko VS, Malakhov VA, Potapov AA. Morphological Changes of the Brain Tissue in Rats with Experimental Model of Ischemic Stroke in the Dynamics of Treatment by Immunobiological Preparation Cryocell-Cryocord. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2015 Dec;7(4):58–63. doi: 10.17691/stm2015.7.4.07
33. Morgan BP, Harris CL. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015 Oct 23;14(12):857–77. doi: 10.1038/nrd4657
34. Müller GJ, Stadelmann C, Bastholm L, Elling F, Lassmann H, Johansen FF. Ischemia Leads to Apoptosis-and Necrosis-like Neuron Death in the Ischemic Rat Hippocampus. *Brain Pathology*. 2006 Apr 5;14(4):415–24. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00085.x
35. Ooigawa H, Nawashiro H, Fukui S, Otani N, Osumi A, Toyooka T, et al. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathologica*. 2006 Jul 21;112(4):471–81. doi: 10.1007/s00401-006-0108-2
36. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5-th ed. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
37. Rami A. Review: Autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2009 Oct;35(5):449–61. doi: 10.1111/j.1365-2990.2009.01034.x
38. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade: Novel Fluorochromes for Detecting Toxicant-Induced Neuronal Degeneration. *Toxicologic Pathology*. 2000 Jan;28(1):91–9. doi: 10.1177/019262330002800111
39. Soontornniyomkij V, Chang RC, Soontornniyomkij B, Schilling JM, Patel HH, Jeste DV. Loss of Immunohistochemical Reactivity in Association With Handling-Induced Dark Neurons in Mouse Brains. *Toxicologic Pathology*. 2020 Jan 3;48(3):437–45. doi: 10.1177/0192623319896263
40. Wagner D-C, Scheibe J, Glocke I, et al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta neurobiol. Exper*. 2013. 73(1):79–87.
41. Zille M, Farr TD, Przesdzin I, Müller J, Sommer C, Dirnagl U, et al. Visualizing Cell Death in Experimental Focal Cerebral Ischemia: Promises, Problems, and Perspectives. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2011 Nov 16;32(2):213–31. doi: 10.1038/jcbfm.2011.150

Поступила в редакцию 5.04.2021

Принята в печать 28.05.2021

Received 5.04.2021

Accepted 28.05.2021

Для цитирования: Авдеев Д.Б., Степанов С.С., Горбунова А.В., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М., Акулинин В.А., Коржук М.С., Заболотных М.В. Темные нейроны сенсомоторной коры белых крыс после острой неполной ишемии в аспекте артефактов фиксации и нейроглиальных взаимоотношений. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2021; 10(2): 9–20. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-2-9-22

For citation: Avdeev D.B., Stepanov S.S., Gorbunova A.V., Shoronova A.Yu., Makar'eva L.M., Akulinin V.A., Korzhuk M.S., Zabolotnykh M.V. Dark Neurons of the Sensorimotor Cortex of White Rats after Acute Incomplete Ischemia in Terms of Artifacts Fixation and Neuroglial Relationships. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2021; 10(2): 9–20. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-2-9-22