

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования**

**«Волгоградский государственный медицинский университет»**

**Министерства здравоохранения Российской Федерации**

**Государственное бюджетное учреждение**

**Волгоградский медицинский научный центр**

*на правах рукописи*

**МЕДНИКОВ**

**Дмитрий Сергеевич**

**Морфофункциональные изменения гиппокампа при экспериментальном  
моделировании цереброваскулярной болезни**

3.3.2. – патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Смирнов Алексей Владимирович

**Волгоград 2022**

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>13</b>
1.1. Современные представления о цереброваскулярной болезни.....	13
1.2. Морфофункциональные изменения в гиппокампе при различных формах цереброваскулярной болезни.....	15
1.3. Моделирование цереброваскулярной болезни у лабораторных животных.....	26
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>34</b>
2.1. Экспериментальные животные и моделирование цереброваскулярной болезни.....	34
2.2. Методы качественного и количественного морфологического исследования.....	39
2.3. Статистическая обработка и анализ данных.....	43
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>45</b>
3.1. Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии.....	45
3.1.1. Структурно-функциональные изменения в гиппокампе крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии .....	45
3.1.2. Иммунофенотипическая характеристика гиппокампа крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии.....	63
3.2. Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс при моделировании стеноза общих сонных артерий.....	85
3.2.1. Структурно-функциональные изменения в гиппокампе крыс при	

моделировании стеноза сонных артерий .....	85
3.2.2. Иммунофенотипическая характеристика гиппокампа крыс при моделировании стеноза общих сонных артерий.....	94
3.3. Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс при фармакологической коррекции .....	107
3.3.1 Фармакологическая коррекция глиатилином.....	107
3.3.2. Фармакологическая коррекция С-40.....	112
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>118</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>140</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>142</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>146</b>
<b>ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....</b>	<b>147</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>148</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>150</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Цереброваскулярные болезни являются разнородной по этиопатогенетическим признакам группой заболеваний, которые обусловлены нарушением церебрального кровотока и ишемическим поражением головного мозга, приводящим к морфологическим и функциональным изменениям (Антоненко Л.М., Вахнина Н.В., Громова Д.О., 2020; Емелин А.Ю. и соавт., 2021; Парфенов В.А., 2020; Преображенская И.С., 2014). По данным Всемирной организации здравоохранения, на март 2015 года число людей, страдающих сосудистой деменцией оценивается в 47,5 млн. и по прогнозам аналитиков к 2030 году ожидается увеличение заболеваемости почти в два раза (до 75,6 млн). Кроме того, острые формы цереброваскулярной болезни остаются на сегодня второй среди причин смертности от неинфекционной патологии в мире, уступая лишь ишемической болезни сердца (Dementia. Fact sheet N°362, 2015). Распространенность основных факторов развития цереброваскулярной болезни – атеросклероза, гипертонической болезни, сахарного диабета, наряду с отчетливой тенденцией к увеличению продолжительности жизни, приводят к неуклонному росту в группе ЦВБ хронических прогрессирующих форм. Частый исход прогрессивного хронического течения ЦВБ в сосудистую деменцию, а также значительная доля сосудистой и смешанной деменции в структуре инвалидности делают ЦВБ не только медицинской, но и социально-значимой проблемой (Суслина З.А. и соавт., 2016; Калинина А.М. и соавт., 2020; Старчина Ю.А., Захаров В.В., 2021). Помимо этого, известно, что факторы риска ЦВБ зачастую пересекаются с факторами риска нейродегенеративных когнитивных нарушений, а по данным патоморфологических исследований около 80% умерших с различными формами ЦВБ имеют и признаки нейродегенерации (Гаврилова С.И., Колыхалов И.В., 2014). Этот факт, а также ограниченность перспектив восстановления утраченных функций мозга, сложности в реабилитации и

адаптации пациентов с тяжелыми формами ЦВБ определяют поиск и разработку методов, направленных на диагностику самых ранних проявлений ишемии головного мозга, оптимизацию подходов к прогнозированию и лечению пациентов с додементными стадиями изменениям (Степанов В.А. и соавт., 2020; Емелин А.Ю. и соавт., 2021; Парфенов В.А., 2020). В связи с этим, безусловный интерес приобретает всестороннее изучение гиппокампа, как важнейшей структуры лимбической системы, принимающей участие в формировании и регуляции когнитивных функций, ориентации в пространстве, механизмах кратковременной и долгосрочной памяти. Кроме того, гиппокамп является одной из наиболее уязвимых структур головного мозга к различным повреждающим воздействиям, в первую очередь к ишемии.

### **Степень разработанности темы исследования**

В последние годы накоплены многочисленные данные о морфофункциональных изменениях, возникающих в гиппокампе при различных формах цереброваскулярной болезни (Степанов В.А. и соавт., 2020, Экова М.Р. и соавт., 2018, Суслина З.А. и соавт., 2016). Исследование изменений в различных отделах головного мозга в ответ на ишемическое повреждение при артериальной гипертензии, а также выявление закономерностей морфофункциональной реорганизации и механизмов, лежащих в основе повреждения нейронов и межнейронных связей остаются на сегодняшний день одной из важнейших проблем медицины (Антоненко Л.М. и соавт., 2020, Бонь Е.И., и соавт., 2018, Вагнер Н.Е. и соавт., 2020). Всестороннее исследование морфологической реорганизации нейро-глио-сосудистых комплексов необходимо для полного понимания и теоретического обоснования патогенетических механизмов повреждения и клеточной гибели, что имеет прикладное значение для прогноза и подхода к оценке репаративных способностей различных структур головного мозга при ишемии (Горбунова А.В. и соавт., 2019, Калинина Ю.А. и соавт., 2019, Бонь Е.И. и соавт., 2019). Компоненты лимбической системы, различающиеся по

структурным и функциональным признакам, играют основную роль в возникновении и прогрессировании нарушений когнитивной и эмоциональной сфер на различных стадиях сосудистой деменции. Гиппокамп принимает участие в реализации механизмов памяти и внимания, отвечает за формирование и регуляцию когнитивных навыков, что в конечном счете во многом определяет качество жизни. Наиболее чувствительными к гипоксии являются нейроны пирамидного слоя гиппокампа, в которых отмечается формирование селективных полей апоптоза при моделировании преходящей ишемии (Кошман И.П. и соавт., 2020, Кулеш А.А. и соавт., 2021, Экова М.Р. и соавт., 2018). Несмотря на значительные успехи в изучении цереброваскулярной болезни, механизмы, лежащие в основе клеточного повреждения и гибели, а также процессы репарации и адаптации в гиппокампе при ишемии головного мозга являются неполноценными, что актуализирует исследования морфологического субстрата структурных и функциональных изменений при цереброваскулярной болезни.

### **Цель исследования**

Охарактеризовать морфофункциональные изменения гиппокампа крыс в условиях моделируемой гипертензивной энцефалопатии и моделируемого стеноза общих сонных артерий.

### **Задачи исследования**

1. Изучить качественными и количественными методами особенности и закономерности структурной реорганизации гиппокампа крыс в условиях моделируемой гипертензивной энцефалопатии и моделируемого стеноза сонных артерий.

2. С использованием морфометрического и иммуногистохимического методов исследования охарактеризовать признаки повреждения нейронов с учетом изменения экспрессии маркеров каспаза-зависимого и каспаза-независимого апоптоза, проапоптотических и антиапоптотических белков из

суперсемейства bcl-2, различных изоформ NO-синтаз (iNOS, eNOS, nNOS) и сериновой рацемазы в различных зонах гиппокампа крыс при моделировании цереброваскулярной болезни.

3. С использованием иммуногистохимического метода определить иммунофенотипическую характеристику экспрессии маркеров адаптивных и репаративных процессов (GFAP, белков теплового шока Hsp70 и Hsp90) в гиппокампе крыс при моделировании цереброваскулярной болезни.

4. Охарактеризовать морфологические признаки активации аутофагии в различных зонах гиппокампа крыс с учетом изменения экспрессии маркеров аутофагии LAMP-2 и beclin 1 при моделировании цереброваскулярной болезни.

### **Научная новизна исследования**

На основании комплексного морфологического исследования с применением иммуногистохимического метода исследования в сочетании с программным компьютерным морфометрическим анализом установлено, что в гиппокампе крыс при экспериментальном моделировании острых и хронических форм цереброваскулярной болезни процессы обратимого и необратимого повреждения преобладают в зонах CA1 и CA3 пирамидного слоя и выражаются в значительном нарушении цитоархитектоники, связанным с дегенеративными изменениями нейронов и адаптационной реорганизацией нейропиля.

Впервые при исследовании механизмов регулируемой клеточной гибели показано, что в пирамидных нейронах CA1 гиппокампа крыс с моделируемыми острой и хронической формами цереброваскулярной болезни наиболее выражено увеличение экспрессии маркера каспаз-независимого апоптоза AIF в сочетании с различиями в экспрессии проапоптотического маркера bax на фоне отсутствия экспрессии каспазы-3.

Впервые при экспериментальном моделировании цереброваскулярной болезни с использованием иммуногистохимического метода показаны

различия экспрессии трех изоформ NO-синтаз (iNOS, eNOS, nNOS) в нейронах и нейропиле, а также в эндотелии капилляров, что сопровождается увеличением экспрессии iNOS во всех зонах гиппокампа, при этом наиболее выраженным в СА3 пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией.

Установлено, что в СА1 пирамидного слоя гиппокампа крыс при моделировании цереброваскулярной болезни увеличивается экспрессия сериновой рацемазы, что сопровождается транслокацией иимунореактивного материала в дендриты, располагающиеся в радиальном слое, что свидетельствует о нарушении NMDAR-опосредованной нейротрансмиссии. Показана адаптивная реакция астроцитарной глии, сопровождающаяся увеличением относительной плотности нейропиля, реактивного астроглиоза и увеличением экспрессии астроцитарного белка GFAP.

Впервые при проведении многоуровневого патоморфологического исследования показано, что повреждение нейронов пирамидного слоя гиппокампа крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии сопровождается увеличением цитоплазматической экспрессии маркеров аутофагии beclin 1 и LAMP-2 в нейронах пирамидного слоя СА2, что является морфологическим признаком активации механизмов аутофагии в сочетании с активацией нейропротективных процессов и подтверждается увеличением экспрессии белков теплового шока Hsp70 во всех зонах гиппокампа, при этом в СА1 экспрессия Hsp70 и Hsp90 увеличивалась совместно.

### **Научно-практическая значимость**

Результаты исследования существенно уточняют сведения о патоморфологических особенностях гиппокампа при моделировании гипертензивной энцефалопатии и стеноза общих сонных артерий. Полученные данные о механизмах повреждения, клеточной гибели, аутофагии, реализации адаптивных изменений позволяют расширить имеющиеся представления о патоморфогенезе заболеваний и состояний,



сопровождающихся ишемией головного мозга, могут быть экстраполированы на человека и в последующем внедрены в патологоанатомическую практику для оптимизации принципов и подходов к дифференциальной диагностике различных форм цереброваскулярной болезни, а также в фармакологические исследования для поиска и разработки новых методов патогенетической терапии гипертензивной энцефалопатии и хронической ишемии головного мозга.

### **Методология и методы исследования**

Работа представляет собой экспериментальное исследование и была выполнена на 55 белых крысах-самцах линии «Вистар» в возрасте 12 месяцев. Моделировались две формы цереброваскулярной болезни – гипертензивная энцефалопатия и стенозирование общих сонных артерий, а также две группы с фармакологической коррекцией гипертензивной энцефалопатии препаратами глиатилин и С-40. Моделирование гипертензивной энцефалопатии осуществлялось путем многократных длительных воздействий отрицательных перегрузок в каудо-краниальном векторе. Стеноз общих сонных артерий моделировался путем частичного ограничения кровотока с помощью наложения лигатур. Объектом для морфофункционального исследования являлся гиппокамп. В работе были использованы современные морфологические методы (гистологический, иммуногистохимический, метод программной компьютерной морфометрии), статистический анализ и специализированное технологическое оборудование ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России и лаборатории патоморфологии ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», что позволило выполнить поставленные цели и задачи. Исследование было одобрено Региональным независимым этическим комитетом.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Морфофункциональные изменения гиппокампа у крыс с моделируемой цереброваскулярной болезнью характеризуются наиболее

выраженными процессами повреждения нейронов пирамидного слоя, активацией каспаза-независимого апоптоза с увеличением экспрессии AIF, сопровождающимися увеличением экспрессии iNOS в сочетании с увеличением экспрессии и транслокацией сериновой рацемазы, что свидетельствует об активации эксайтотоксических механизмов.

2. При моделировании цереброваскулярной болезни процессы повреждения сопровождаются увеличением цитоплазматической экспрессии маркеров аутофагии beclin 1 и LAMP-2 в нейронах пирамидного слоя гиппокампа крыс в сочетании с увеличением экспрессии белков теплового шока Hsp70, Hsp90, что является морфологическим признаком активации механизмов шаперон-зависимой аутофагии.

3. При моделировании гипертензивной энцефалопатии в пирамидных нейронах гиппокампа отмечается активация нейропротективных процессов, сопровождающаяся увеличением экспрессии антиапоптозного маркера bcl-2. Адаптивные процессы сопровождаются увеличением относительной плотности нейропиля, реактивным астроглиозом с увеличением уровня экспрессии GFAP.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, адекватных для поставленных задач современных методах исследования, статистическим анализом значимости выявленных изменений.

Основные результаты диссертационного исследования докладывались и обсуждались на 73-й и 74-й открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2015, 2016); 19-й, 20-й Всероссийских медико-исторических конференциях студентов и молодых ученых (Казань, 2016, 2017); XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов

и молодых ученых (Москва, 2017); XIII Всероссийской Бурденковской студенческой научной конференции (Воронеж, 2017); 90-й всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Мечниковские чтения-2017» (Санкт-Петербург, 2017); Alzheimer's Association International Conference (London, 2017; Los Angeles, 2019; Chicago, 2020); V съезде Российского общества патологоанатомов (Челябинск, 2017); Всероссийской конференции молодых специалистов (Рязань, 2017); VIII съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019); Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2020).

### **Публикации по теме работы**

По теме диссертации опубликована 23 научные работы, из них 10 в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, в том числе 3 из перечня журналов, индексируемых базой данных Scopus и 1 из перечня журналов, индексируемых базой данных Web of Science.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и 59 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 203 источника, в том числе, 57 отечественных и 146 зарубежных.

### **Внедрение результатов исследования**

Основные результаты работы использованы в образовательном процессе на кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО «Волгоградский

государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, внедрены в научную работу ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», практическую работу ГБУЗ «Волгоградское областное патологоанатомическое бюро», ЧУЗ «РЖД-Медицина»».

### **Личный вклад**

Автору принадлежит основная роль в разработке дизайна исследования, заборе, фиксации, окраске с применением иммуногистохимической реакции экспериментального материала. Самостоятельно выполнено морфологическое и морфометрическое исследование, проведена статистическая обработка, полученных данных, их анализ и написание текста диссертации. Автор принимал непосредственное участие в написании тезисов, научных статей и подготовке их к публикации в научных изданиях. Участвовал в роли докладчика на различных отечественных и международных конференциях.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1.Современные представления о цереброваскулярной болезни**

ЦВБ (цереброваскулярные болезни) являются на сегодняшний день одной из важнейших медико-социальных проблем [9, 18, 40]. Ежегодно инсульт переносят около 15 миллионов человек, из которых 5 миллионов умирают. В Российской Федерации ежегодно регистрируется более 400 новых случаев инсульта на 100 тысяч населения. Кроме того, последствия тяжелых острых НМК (нарушений мозгового кровообращения), а также хронические формы становятся причиной инвалидизации и представляют собой серьезную социальную и экономическую проблему [9, 18, 48]. Демографический фактор и тенденция к омоложению дебюта, повсеместная распространенность основных патогенетических факторов цереброваскулярной болезни обуславливают поиск адекватных методов профилактики, а также лечения и реабилитации пациентов [17, 40]. Являясь междисциплинарной проблемой, цереброваскулярные болезни привлекают внимание как научно-прикладной, так и практической медицины. Важнейшими аспектами по современным представлениям являются: патогенетический подход к диагностике и лечению с учетом общности механизмов развития при различных нозологических формах, стратификация факторов риска развития и прогрессирования, разработка методов предупреждения или ликвидации факторов риска с учетом патоморфоза цереброваскулярной болезни [9, 18, 28]. Острым нарушениям мозгового кровообращения зачастую предшествуют хронические формы сосудистой патологии, развивающиеся длительно на протяжении многих лет. Хроническая недостаточность мозгового кровообращения – один из самых распространенных синдромов в неврологии, а многообразие клинических вариантов данной патологии позволило выделить ее в отдельное направление – ангионеврологию [9, 28]. Среди хронических форм нарушений мозгового кровообращения наибольшее распространение имеют дисциркуляторная энцефалопатия и начальные проявления недостаточности кровоснабжения

головного мозга. На сегодня известно большое количество этиологических факторов расстройств церебральной гемодинамики и, без сомнения, важнейшими из них являются атеросклеротическая болезнь и артериальная гипертензия [3,14, 28].

Вопрос единого подхода к классификации ЦВБ остается на сегодня открытым, поскольку до настоящего момента не разработано терминологии, которая бы полностью учитывала все аспекты этой разнородной группы заболеваний [28, 40]. Принцип преимущественного поражения сосудистой системы головного мозга положен в основу классификации цереброваскулярной патологии в МКБ-10, где различные варианты представлены в рубриках I60-I69, при этом исключены рубрики G45 – транзиторные церебральные ишемические приступы и родственные синдромы; F01 – сосудистая деменция и S06 – травматическое внутричерепное кровоизлияние. Отдельные нозологические формы рубрифицируются как I63 – инфаркт мозга (с возможностью указания пораженного прецеребрального или церебрального сосуда), I65 – закупорка и стеноз прецеребральных артерий, не приводящие к инфаркту мозга (с возможностью указывать конкретный пораженный сосуд); I66 – закупорка и стеноз церебральных артерий, не приводящие к инфаркту мозга (с возможностью указывать конкретный пораженный сосуд). Хронические формы ЦВБ классифицируются на основании синдромологического подхода и представлены в следующих рубриках: I67 – другие цереброваскулярные болезни (I67.2 – церебральный атеросклероз, I67.3 – прогрессирующая сосудистая лейкоэнцефалопатия, I67.3 – болезнь Бинсвангера, I67.4 – гипертензивная энцефалопатия, I67.8 – другие уточненные поражения сосудов мозга, ишемия мозга хроническая). Рубрика I69 – последствия цереброваскулярных болезней собирает в себе причины последствий, которые классифицированы в других рубриках. Понятие "последствия" включает состояния, уточненные как таковые, как остаточные явления или как состояния, которые существуют в течение года или более с момента

возникновения причинного состояния. При этом, не рекомендовано применять коды из данной рубрики к хроническим формам ЦВБ, которые размещены в рубриках I60-I67 [28, 34].

## **1.2. Морфофункциональные изменения в гиппокампе при различных формах цереброваскулярной болезни**

В литературных источниках накоплено множество публикаций, посвященных развивающимся при цереброваскулярной патологии морфологическим и функциональным изменениям в гиппокампе. Однако, имеющиеся данные зачастую противоречивы, что связано с разнообразием клинических вариантов, несовершенством моделей и отсутствием единой, удовлетворяющей всех терминологии. Тем не менее, можно выделить определенные закономерности в патогенезе очаговых и диффузных изменений, возникающих при стенозе и облитерации артерий, характерных для атеросклеротической болезни и артериальной гипертензии. Выраженность этих изменений, в первую очередь, связана с продолжительностью и глубиной ишемизации. Ряд авторов сообщает о большей уязвимости зон СА1 и СА3 по сравнению с зонами СА2 и СА4 [6, 32, 168]. Преобладание процессов повреждения над компенсаторными процессами выражается в дегенеративных изменениях пирамидных нейронов [6, 46, 169]. При этом, нет единой точки зрения, о том, какие признаки свидетельствуют однозначно в пользу необратимости или обратимости повреждения. По классическим представлениям, очаговый хроматолиз и гиперхромия без сморщивания перикариона считаются признаками обратимого повреждения, а гиперхромия в сочетании с пикноморфной деформацией, а также тотальный хроматолиз (формирование клеток-теней) говорят в пользу необратимых изменений [20, 32, 153, 155]. Данный подход к оценке повреждения не учитывает ряд важных критериев, таких как: патологическая извитость отростков пирамидных нейронов, патология ядрышка. Ввиду этого, более оправданно предполагать необратимое повреждение в совокупности изменений, развивающихся как в

нейронах, так и в сосудах микроциркуляторного русла, с учетом реакции глиальных клеток [126, 153, 155]. Особый интерес представляет поиск возможностей для оценки репаративного потенциала нейрона и способности к адаптации в условиях хронической гипоксии. Известно, что главным пусковым звеном в каскаде биохимических и морфологических изменений в нейронах является ишемия, причем даже кратковременная, но достаточно выраженная, может приводить к глубоким нарушениям [6, 126, 169]. Так, в ряде работ сообщается о возникновении морфологических изменений в нейронах гиппокампа крыс уже после двух минут ишемии [5, 6, 153, 155]. Среди множества звеньев патогенеза гипоксического повреждения, центральное значение имеют оксидативный и нитрозативный стресс, нарушение баланса внутриклеточных потенциалопределяющих ионов, эксайтотоксичность, активация нейровоспалительной реакции [5, 6, 87]. Каждый из этих механизмов в разной мере обуславливает как первичное, так и вторичное повреждение нейронов, зачастую заканчивающееся гибелью клетки [87, 126, 155]. Перспективным в отношении оценки повреждения, компенсаторно-приспособительных возможностей и влияния на регулирующую клеточную смерть могут быть биохимические маркеры, визуализируемые при иммуногистохимическом исследовании. Большой интерес представляет изучение различных форм NO-синтаз, поскольку они вовлечены во многие из механизмов нейронального повреждения, усугубляя ишемический каскад и утяжеляя клиническую картину цереброваскулярных болезней [41, 86, 124]. Нарушение функционирования NO-синтаз играет важную роль в развитии нейродегенеративных болезней, так как оксид азота является модулятором нейропластичности. Это особенно важно в связи с тем, что в условиях возникающего при ишемии оксидативного стресса оксид азота, взаимодействуя с ядовитыми формами кислорода становится источником пероксинитрила и способствует свободнорадикальному повреждению [41, 43, 124]. Синтез оксида азота происходит при участии трех изоформ NO-синтаз: индуцибельной (iNOS), эндотелиальной (eNOS) и



нейрональной (nNOS). На модели временной окклюзии средней мозговой артерии была показана взаимосвязь iNOS/nNOS с выживаемостью нейронов в гиппокампе крыс [108, 187]. Спустя 24 часа после окклюзии отмечается снижение числа nNOS-позитивных и увеличение числа iNOS-позитивных нейронов [72]. В то же время, на моделях сосудистой деменции у крыс линии SHR (spontaneously hypertensive rats), продемонстрировано, что экспрессия nNOS оставалась неизменной, тогда как iNOS выраженно экспрессировался в пирамидных нейронах гиппокампа, при этом ферментативная активность и nNOS, и iNOS резко снижалась. Необходимо отметить, что выраженность экспрессии iNOS коррелировала с длительностью заболевания. Так, у SHR-крыс на 23 неделе эксперимента количество iNOS-позитивных нейронов оказалось выше, чем у животных на 4 неделе [108]. Безусловный интерес вызывает исследование уровня экспрессии eNOS в гиппокампе, поскольку сообщено о его потенциально нейропротективных возможностях [102]. Известно о прямой корреляции между уровнем eNOS и риском развития ишемического инфаркта головного мозга. На модели мышей с нокаутом eNOS было продемонстрировано, что ишемические инфаркты, связанные с тромботической окклюзией, развиваются уже с возраста 3 месяца, тогда как у контрольных животных тромботическая окклюзия не наблюдалась ни в одной из возрастных групп. Примечательно, что окклюзия сосудов развивалась почти исключительно в трех областях головного мозга: височно-теменной, ретроспленальной зернистой коре и гиппокампе. Кроме того, у старых мышей с дефицитом eNOS выявлено повреждение гематоэнцефалического барьера и прогрессирующая амилоидная ангиопатия [179]. В другом исследовании показано, что дефицит eNOS у мышей и снижение NO в эндотелии микроциркуляторного русла приводит к усилению продукции белка-предшественника амилоида (APP) и амилоидных  $\beta$ -пептидов ( $A\beta$ 1-40 и  $A\beta$ 1-42) [43]. Также, у eNOS-нокаутных мышей доказано развитие провоспалительного фенотипа и активация микроглии, активация астроцитарной глии, а поведенческий анализ показал снижение когнитивных

функций [23, 43]. Таким образом, можно предполагать, что eNOS является одной из ключевых молекул, влияющих на функцию как нейрона, так и глии, участвующей в синаптической пластичности, митохондриальном биогенезе и функционировании прогениторных клеток.

Эксайтотоксичность – активно изучаемый в настоящее время универсальный механизм вторичного повреждения. Эксайтотоксичность вовлечена во многие патологические процессы и связана с гиперстимуляционным действием или нарушенным обратным захватом возбуждающих нейромедиаторов. В глутаматергических синапсах выделяют два основных класса рецепторов, называемых рецепторами N-метил-D-аспартата (NMDAR) и аминокислоты 3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA). В условиях патологии, в том числе при ишемии, травмах и нарастающем отеке головного мозга, глутамат оказывает избыточное постсинаптическое действие на NMDAR [30, 116, 140]. Возникающие вслед за гиперактивацией NMDAR изменения ведут к нарушению клеточного гомеостаза, внутриклеточному ацидозу, повышенному содержанию свободного кальция и образованию свободных радикалов, повреждению мембран митохондрий, а также усиленной продукции проапоптотических протеинов и ранних генов смерти. Кроме того, сообщается о роли глутаматного повреждения в активации нитрооксидсинтаз [140, 166]. Избыточное стимулирование NMDAR и AMPAR – важный этап в ишемическом каскаде, который развивается не только в ядре ишемии, но и в зоне ишемической полутени. D-серин выступает в роли ко-агониста NMDAR и в нормальных условиях вовлечен в процессы обучения и памяти [198]. Однако, во многих исследованиях предполагается его роль в глутаматном повреждении. Образование D-серина в нейронах и глиальных клетках происходит с участием фермента сериновой рацемазы (SR) из L-серина [198]. Увеличение содержания SR и продукта его ферментативной реакции – D-серина, по данным ряда авторов, опосредуют эксайтотоксическое повреждение путем связывания D-серина в глицин-связывающем сайте

NMDAR и увеличивая, таким образом, его сродство к глутамату [62, 140]. Специфическое ингибирование CP предлагается рядом исследователей как многообещающий нейропротективный механизм [140, 170].

Система белков теплового шока (heat shock protein, Hsp) выступает в роли внутриклеточных молекул-шаперонов, ответственных за поддержание нормального внутриклеточного гомеостаза путем регуляции правильного свертывания вновь синтезированных пептидов, а также транспорта и деградации зрелых белков. Члены семейства Hsp участвуют в каждом этапе протеостаза, способствуя свертыванию белка, регулируя скорость синтеза и деградации протеинов, предотвращая дополнительные конформационные изменения и самоагрегацию неправильно свернутых, частично денатурированных белков с помощью убиквитин-протеосомной системы и путей аутофагии [92, 151, 165]. Помимо своей роли шаперонов, белки семейства Hsp стабилизируют мембрану клетки и ингибируют каскад каспаза-зависимого апоптоза. Семейство Hsp было предложено классифицировать на разные подсемейства по молекулярной массе: Hsp100 (100 кДа), Hsp90 (90 кДа), Hsp70 (70кДа), Hsp60 (60 кДа), Hsp40 (40 кДа) и небольшие семейства Hsp, включая убиквитин [92, 127, 151]. Тем не менее, постоянно увеличивающееся количество и вызванные этим несоответствия в их маркировке привели Kamperinga et al. к идее ввести новую номенклатуру семейства Hsp человека. В настоящее время Hsp подразделяются на следующие группы: HspH (Hsp110), HspC (Hsp90), HspA (Hsp70), DNAJ (Hsp40), HspB (малый Hsp) и семейства шаперонинов HspD/E (Hsp60/Hsp10). Каждое из подсемейств имеет конститутивный доминирующий белок, который играет ключевую роль в работе всех членов подсемейства. Также, общей чертой всех Hsp является присутствие гидрофобного терминального С-сегмента, отвечающего за связывание с полипептидом, обеспечивающее фолдинг и транспортировку [92, 127, 165]. Наиболее изученным подсемейством является Hsp70, однако, данные, касающиеся функционирования этого подсемейства в пирамидных нейронах гиппокампа

являются противоречивыми. Так, в исследовании на модели стеноза общих сонных и позвоночных артерий в гиппокампе крыс было продемонстрировано снижение экспрессии Hsp70 [202]. В то же время, изучение уровня Hsp70 на модели гипертензивной энцефалопатии у крыс линии SHR выявило повышение экспрессии в пирамидных нейронах CA1 [181]. Значение дальнейшего изучения многообразных функций Hsp тем более важно в их связи с участием в регуляции апоптоза. Например, имеются данные об участии Hsp70 в ингибировании митохондриального пути активации апоптоза способом образования комплекса Hsp70/Bax и предотвращения транслокации Bax к мембране митохондрии [97]. Hsp90 также обеспечивает не только мембраностабилизирующие но и антиапоптотические эффекты, образуя цитозольный комплекс с Araf-1 и блокируя активацию апоптосомы, а кроме того, шаперонируя протеинкиназы рецепторов стероидных гормонов или белка p53 [121, 147]. Члены подсемейства Hsp90 – самые распространенные белки в клетках, составляя 1-2% от общего содержания клеточного белка [120]. Необходимо отметить важнейшую функцию Hsp90, а именно обеспечение шаперонзависимой аутофагии – высокоселективного непрерывного процесса утилизации поврежденных и дефектных белков. Связывая субстрат аутофагии на C-сегменте, Hsp90 доставляет его к лизосоме, где взаимодействует с белком LAMP2A, образует олигомерный комплекс и транслоцирует субстрат в просвет лизосомы [63].

Приобретение астроглией реактивного фенотипа описано для различных патологических процессов, включая ишемию головного мозга [104]. Под реактивным фенотипом понимается, в том числе, активация и перестройка промежуточных филаментов (IF): глиального фибриллярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein, GFAP), нестина, виментина, синемина. Как в норме, так и при повреждении, GFAP является одним из важнейших белков цитоскелета астроцитов, выступая энергетическим субстратом для астроглии при дифференцировке и для нейронов при

повышении нейропластичности [24, 27, 104]. В исследованиях, проведенных на GFAP-нокаутных грызунах была продемонстрирована пониженная способность нейронов к выживанию, в то же время в гиппокампе усиливалась нейропластичность при частичной деафферентации при повреждении энторинальной коры. GFAP принимает участие в двух важнейших аспектах нейропротекции при церебральной ишемии – нейрогенезе и нейровоспалении. Так, при исследовании крыс с моделируемой фокальной ишемией головного мозга, было показано усиление экспрессии GFAP в CA1 гиппокампа, а также усиление экспрессии *de novo* даблкортина (DCX) в GFAP-позитивных клетках [99]. При изучении нейровоспалительного фенотипа на модели сосудистой деменции у SHR-крыс была обнаружена выраженная атрофия головного мозга и повреждение периваскулярных астроцитов с усилением экспрессии как маркера реактивного астроглиоза - GFAP, так и маркера микроглии – изолектина-IB4 [180]. Учитывая довольно ограниченные возможности пролиферации резидентных прогениторных клеток во взрослом организме и ограничение нейрогенеза лишь субвентрикулярной зоной боковых желудочков (латеральные стенки, СВЗ) и зернистым слоем зубчатой извилины гиппокампа (субгранулярная зона, СГЗ), на данный момент актуален поиск способов направленного нейрогенеза [23]. В настоящее время рассматривается теория нейрогенеза вне этих двух зон в организме взрослых млекопитающих, при участии GFAP. Сообщается об обнаружении GFAP-позитивных клеток, несущих на себе метку делящихся прогениторов в стриатуме и черной субстанции [81, 99]. Активность нейрогенеза в этих структурах значительно ниже, чем в СВЗ и СГЗ и предполагается, что повреждение, в том числе ишемическое, способно стимулировать и ускорять нейрогенез. По данным ряда исследований, к функциям GFAP относится организация синаптических контактов, направленный рост астроцитарных отростков, участие в ангиогенезе, а также в синтезе миелина [27, 39, 122]. На основании вовлеченности GFAP в процессы нейрогенеза, регенерации и репарации, он стал потенциально

многообещающей мишенью исследований в поиске методов ранней дифференциальной диагностики, лечения и реабилитации при ишемии головного мозга различного генеза.

В настоящее время, после долгого периода концептуальных трудностей, сложилось мнение, что клеточная смерть – феномен, возникающий в течение всего жизненного цикла нервной системы, от нейрогенеза до зрелости и старения [123, 141]. Как в нейронах, так и в глиальных клетках контролируемая клеточная смерть реализуется различными путями: апоптоз, аутофагия, пироптоз, онкоз и другими. Эти виды клеточной смерти могут провоцироваться различными повреждающими триггерами, однако имеют общие внутриклеточные пути и определение конкретного реализующего механизма обеспечивается тонкими внутриклеточными взаимодействиями [89, 141]. Контролируемая клеточная смерть, некроз наблюдается главным образом в нейронах, расположенных в ядре ишемии и которые непосредственно и резко подвергаются ограниченному кровотоку [172]. Для прогресса в понимании патофизиологии ишемии головного мозга, учитывая доминирующие молекулярные события, было предложено дифференцировать ишемическую полутень на несколько зон. Зона селективной нейрональной гибели непосредственно прилежит к ядру ишемии, за ней располагается зона индукции белков теплового шока, в следующей зоне выражена экспрессия HIF-1 (индуцируемый гипоксией фактор-1), для наружной зоны пенумбры характерна экспрессия большого количества ранних генов смерти [89, 172]. Было продемонстрировано, что наряду с ключевыми генами некроза и апоптоза, клетки в зоне ишемии экспрессируют характерные для аутофагии белковые маркеры, такие как beclin 1 и LC3-II. На моделях глобальной и фокальной ишемии головного мозга, как и на модели временной окклюзии средней мозговой артерии было отмечено увеличение числа аутофагосом и усиленная экспрессия аутофагических белков в коре, гиппокампе и стриатуме [136, 202]. Аналогичные результаты были получены в экспериментах *in vitro*,

проведенных на первичных культурах нейронов коры, подвергнутых ишемии и на клеточных линиях гиппокампа (HT22) [133, 174]. В то же время, дифференцированный ответ нейронов на ишемическое повреждение подтверждается одновременной активацией как апоптотического, так и аутофагического пути гибели. На модели крыс с временной фокальной ишемией головного мозга, нейроны коры и стриатума, располагавшиеся в зоне ишемической полутени демонстрировали усиленную экспрессию как *beclin 1*, так и эффекторных каспаз [156]. В исследовании на новорожденных крысятах, подвергнутых перевязке общей сонной артерии, в TUNEL-позитивных клетках также выявлялась усиленная экспрессия *beclin 1*. Необходимо отметить, что клетки с признаками как апоптоза, так и аутофагии преимущественно выявлялись в верхних слоях коры головного мозга, в то время как клетки нижних слоев коры и нейроны CA1 гиппокампа в основном экспрессировали маркеры либо аутофагии, либо апоптоза. Важная особенность – лишь в единичных *beclin 1*-позитивных нейронах CA1 и CA2 гиппокампа обнаруживался PI (*propidium iodide* – маркер некроза) [94]; те же результаты были продемонстрированы на модели перинатальной асфиксии [111], что убедительно свидетельствует в пользу использования *beclin 1* как высокоспецифичного маркера, перекрестно регулирующего аутофагию и апоптоз. *Beclin 1* – белок суперсемейства Bcl-2, относящийся к классу ВН-3-белков и играющий решающую роль в формировании преаутофагосомального комплекса *Beclin 1-Vps34-Vps15*, расценивающегося как маркер инициации аутофагии [111, 191]. Ряд исследователей описывает развитие нейродегенеративных процессов в гиппокампе и мозжечке у линии мышей с условным нокаутом *beclin-1*. Эмбриональный фенотип мышей с нокаутом *beclin 1* более тяжелый, чем у мышей с дефицитом других генов аутофагии, и они умирают еще в раннем эмбриональном развитии [143]. *Beclin 1* экспрессируется во многих тканях человека и мыши, и локализуется преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, мембране митохондрий и плазматической мембране [144, 191]. Антиапоптотические

белки bcl-2 и bcl-x1, связываются на ВН-3-домене с beclin 1, таким образом ингибируя его проаутофагическое действие и участвуют в выборе клеткой пути гибели апоптоз/аутофагия. При этом, негативную регуляцию аутофагии обеспечивают белки bcl-2 и bcl-x1, локализованные на эндоплазматическом ретикулуме, но не на митохондриях. Необходимо отметить, что beclin 1 не обладает антиапоптотическим действием [111, 144]. К одним из наиболее перспективных маркеров для выявления аутофагии относится LAMP-2 (lysosomal-associated membrane protein) - интегральный белок, структурный компонент мембран лизосом. Изоформы LAMP-2 служат маркером зрелых аутофагосом, шаперон-зависимой и микроаутофагии [82, 167]. При моделировании субтотальной ишемии с двусторонней окклюзией общих сонных артерий, в гиппокампе крыс было выявлено значительное увеличение зрелых вакуолей, экспрессирующих LAMP-2 и LC3-II, при этом экспрессия катепсина D снижалась [69].

Bcl-2 (B-cell lymphoma) – представитель подсемейства антиапоптотических протеинов, принимающий участие в блокировании митохондриального пути апоптоза [68, 154]. Предупреждая действие эффекторных каспаз, а также блокируя высвобождение AIF (apoptotic inducible factor) и цитохрома C, bcl-2 предотвращает регулирующую клеточную смерть и, таким образом, влияет на выживаемость в условиях повреждения, в том числе при ишемии [138, 154]. Помимо этого, в неактивном состоянии bcl-2 обнаруживается внутриклеточно в виде комплекса с ВН3-протеином beclin 1, при диссоциации которого и высвобождении свободного beclin 1 активируется beclin 1-зависимая аутофагия [138]. Предполагается, что диссоциация комплекса beclin1/bcl-2/bcl-x1 возможна в результате конкурентного замещения на ВН-3-домене проапоптотическими белками из семейства bcl-2 [191]. Бах и бак являются членами проапоптотического подсемейства bcl-2 и основными регуляторами внутреннего пути апоптоза. При апоптотических стимулах они активируются и олигомеризуются на внешней мембране митохондрий, чтобы обеспечить ее пермеабиллизацию, которая считается



ключевым этапом в апоптозе. В физиологических условиях *bax* является в значительной степени цитозольным благодаря постоянной транслокации из митохондрий в цитозоль с помощью *bcl-x1*, что позволяет избежать накопления токсичных уровней *bax* на внешней мембране митохондрий [91, 150]. Уместно добавить, что уровни *bax* и *bak* как в физиологических условиях, так и при моделировании ишемии головного мозга целесообразно рассматривать совместно, поскольку в экспериментах на мышах, дефицитных по этим белкам регистрировался нарушенный апоптоз, в то время как дефицит каждого из них по отдельности не вызывал подобных изменений [76].

Несмотря на многочисленные исследования, новые наблюдения относительно гибели нейронов продолжают, как дополняя, так и существенно меняя известные парадигмы, такие как апоптоз, и обнаруживая до сих пор неописанные формы гибели клеток. Имеющиеся в современной литературе данные, посвященные механизмам нейрональной смерти, можно объединить в три большие концепции: 1) существует множество путей гибели нейрона; 2) существует перекрестная связь между различными способами гибели; 3) гибель нейронов - это не просто «клеточный автономный случай», а зачастую реализуемый через сложные взаимодействия с соседними нейрональными и глиальными клетками [74, 87, 157]. В последнее время появляется все больше данных о важной роли каспаза-независимого апоптоза, ключевую роль в котором играет белок AIF (apoptosis inducing factor, апоптоз-индуцирующий фактор). Более того, сообщается что апоптоз нейронов при инсультах происходит исключительно посредством каспаза-независимого AIF-индуцируемого пути, также называемого партанатос – типа регулируемой клеточной смерти, который зависит от активности PARP (poly-ADP-ribose-polymerase, поли-АДФ-рибоза-полимеразы). PARP обеспечивает транслокацию AIF из митохондрий в ядро и последующую деградацию хроматина [53, 78, 189]. Генетическое или фармакологическое ингибирование PARP-1 и PARP-2 уменьшает

ядерную транслокацию AIF и обеспечивает нейропротекцию при моделировании инсульта [186, 188]. Данные по кинетике AIF в процессе апоптоза являются достаточно противоречивыми. Так, в ряде исследований сообщается, что диссоциация AIF от мембраны митохондрий происходит спустя 12-18 часов после индукции и является частью классического каспаз-зависимого пути апоптоза. Согласно другим работам, транслокация AIF регистрировалась спустя 10-20 минут после индукции, что существенно опережает активацию каспаз-зависимого пути. Вероятно, неоднозначность в механизме и скорости диссоциации связана с существованием двух внутриклеточных пулов AIF – около 70% закреплена на внутренней мембране, в то время как около 30% расположены на цитоплазматической поверхности наружной мембраны митохондрий [53, 61, 199].

### **1.3. Моделирование цереброваскулярной болезни у лабораторных животных**

Необходимость детального изучения патогенеза различных форм цереброваскулярной болезни, поиски фундаментальных основ для совершенствования способов их профилактики, диагностики, лечения и последующей реабилитации требуют адекватных моделей церебральной ишемии [7, 14]. Сложности как в разработке новых моделей, так и в применении уже имеющихся связаны в первую очередь с многообразием и значительными различиями хронических и острых форм ЦВБ. Модели НМК могут быть дифференцированы по величине ишемизированной зоны, по длительности ишемии, уровню снижения кровотока, относительному уровню гипоксии и гипогликемии [7, 85]. Критерии TOAST (Trial of Org in Acute Stroke Treatment) выделяют следующие патогенетические типы инфаркта головного мозга: атеротромботический, гемореологический, кардиоэмболический, лакунарный и гемодинамический [7, 130]. В соответствии с патогенетическим подходом, предложена следующая классификация способов моделирования ишемии головного мозга: глобальная (полная), субтотальная (неполная), частичная, фокальная,

мультифокальная и гипоксическая. Моделирование глобальной ишемии головного мозга добиваются с помощью остановки сердца, декапитации, полной окклюзии аорты и поллой вены. Кроме того, была предложена модель глобальной ишемии, вызванной перегрузками в кранио-каудальном векторе [7, 29, 85]. Эффекты, обусловленные воздействием перегрузок в кранио-каудальном векторе зависят от силы и продолжительности и заключаются в срыве механизмов ауторегуляции мозгового кровотока и перераспределении крови при центробежном ускорении. Данные ряда исследований показывают, что давление в сонных артериях у крыс снижается до нулевого уровня при ускорении уже в 4 g в кранио-каудальном векторе [13, 29]. Метод моделирования глобальной ишемии головного мозга с применением продольных отрицательных перегрузок имеет очевидные преимущества: во-первых, не требует проведения наркотизации животных и оперативного вмешательства; во-вторых, прост в исполнении и близок к патогенезу атеротромботического варианта инфаркта мозга [13, 14]. Субтотальную ишемию воспроизводят двусторонней окклюзией общих сонных артерий; а частичную ишемию, соответственно, ограничением кровотока по одной из общих сонных артерий. Фокальная и мультифокальная ишемия моделируется с помощью лигирования или эмболизации средней мозговой артерии. Гипоксическую ишемию моделируют путем лигирования сонных артерий с последующим вдыханием гипоксической смеси [7, 93, 105]. Полностью воспроизвести все аспекты НМК человека в одной модели на животных невозможно, поскольку ЦВБ у людей является гетерогенным заболеванием со сложной патофизиологией. Модель временной или постоянной ОСМА (окклюзии средней мозговой артерии) признана как одна из максимально близко имитирующих ишемический инсульт у человека, так как в бассейне средней мозговой артерии и ее ветвей развивается, по данным литературы, порядка 70% ишемических инсультов [93, 114]. В связи с относительной простотой воспроизведения, экономической целесообразностью и патогенетической обоснованностью, данная модель была задействована в

большинстве исследований, посвященных изучению острых НМК. В доступной литературе на сегодняшний день можно найти данные по свыше 2600 экспериментов, посвященных изучению нейропротекции после ишемического инсульта, моделируемого путем ОСМА. При этом в более чем 40% экспериментов использовалась модель шовной окклюзии [85, 107]. Моделирование глобальной ишемии может выполняться несколькими методиками. Существует двухэтапный метод, связанный с ограничением кровотока по основным магистральным сосудам – обеим позвоночным и обеим внутренним сонным артериям. Очевидными недостатками моделирования глобальной ишемии мозга являются травматичность методики, двухэтапность и высокая смертность животных, а кроме того ограниченность в экстраполяции результатов на ЦВБ у человека [7, 57]. Модификация двухэтапного метода не привела к улучшению результатов моделирования глобальной ишемии, в связи с чем были разработаны модели одномоментного ограничения кровотока без коагуляции позвоночных артерий, с наложением на них зажимов. Однако, в данной модели глобальной ишемии не была решена проблема высокой смертности, а также было выявлено частое образование коллатерального кровоснабжения [193]. Моделирование глобальной ишемии экстракраниальным методом, с ограничением кровотока в плечеголовном стволе, подключичной и общей сонной артериях предполагает вскрытие грудной полости, это предопределяет риск как интраоперационных, так и отсроченных осложнений, что также подтверждается высокой летальностью в группе ложнооперированных животных [7, 33]. Альтернативным способом моделирования очагового инсульта может служить методика, основанная на применении эндотелина-1 (endothelin-1, ET-1). ET-1 - сильнодействующий сосудосуживающий пептид длительного действия [85, 194]. Аппликация ET-1 может быть выполнена непосредственно на открытую СМА [159], либо же в виде интрацеребральной (стереотаксической) инъекции [109]; существует также модель нанесения ET-1 на поверхность коры [88]. Каждый из

возможных вариантов аппликации ЕТ-1 вызывает дозозависимое ишемическое поражение с маргинальным отеком и типичными морфологическими изменениями как в ядре ишемии, так и в пенумбре [88, 109]. Причем, первые два способа нанесения ЕТ-1 вызывают ишемическое повреждение, сравнимое с вызванным постоянной ОСМА [171], тогда как аппликация на поверхность коры обеспечивает полукруглый инфаркт, который охватывает все корковые слои. Модели эмболического инсульта можно разделить на две категории: модели инсульта, индуцированные микросферой / макросферой и модели тромбоемболического сгустка. Подобным способом моделируются фокальная и мультифокальная ишемия головного мозга, по патогенетическому механизму эти модели описывают кардиоэмболический вариант ишемии [66]. В качестве микросферических эмболов используют сферы диаметром 20–50 мкм из различных материалов, таких как декстран, оксид железа, оксид титана и керамика [105]. Модель макросферической эмболии предусматривает использование более крупных сфер – до 400 мкм. Оба способа эмболизации выполняются введением сфер в наружную, либо внутреннюю сонные артерии с помощью катетера и их пассивная доставка церебральным кровотоком, в зависимости от размера сфер, в проксимальные или дистальные отделы бассейна средней мозговой артерии. Безусловными преимуществами подобной модели является возможность регулировать объем и тяжесть поражения количеством и размерами используемых сфер [158, 196]. Тромбоемболическая модель инсульта основывается на использовании спонтанно образованных сгустков или тромбин-индуцированных сгустков из аутологичной крови. Другой метод индукции сгустков заключается в инъекции тромбина непосредственно во внутричерепной сегмент внутренней сонной или в СМА [60, 64].

Мозговое кровоизлияние является подтипом инсульта с высоким уровнем летальности и инвалидизации. Продолжается поиск патогенетически обоснованных подходов к диагностике, лечению и

реабилитации, которое эффективно увеличивает выживаемость или улучшает качество жизни выживших [48, 52, 134]. Вместе с этим идет и поиск оптимальных моделей, позволяющих наиболее полно воспроизводить все аспекты геморрагического инсульта, детализировать патофизиологические механизмы и терапевтический потенциал. Для решения этих задач предлагались различные методики моделирования мозгового кровоизлияния: модели с однократной и двойной инъекциями аутологичной крови, модель инфузии бактериальной коллагеназы, модель дозированной травмы и другие [117, 134, 164]. Самый простой метод введения крови и образования гематомы - это одномоментная инъекция. В экспериментах на крысах Sprague-Dawley животным вводилось 0,24-0,28 мл цельной или центрифугированной крови от других крыс без анестезии в область базальных ганглиев [129, 164]. Преимуществами данной методики являются возможность использовать ненаркотизированных крыс и относительная простота воспроизведения. Однако, летальность животных составила 25%, кроме того введение донорской крови несет в себе риск развития воспаления, а также кровь вводится без условий повышенного артериального давления. Исследователи обращали внимание на успешное моделирование эффектов, связанных с нарастающей гематомой в первой фазе инсульта, при этом эффектов вторичного повреждения, связанных с формированием отека добиться не удавалось. Эти факторы значительно мешают имитировать клиническую ситуацию, наблюдаемую у людей. Последующие модификации, пытавшиеся решить эти проблемы, привели к серьезному техническому и экономическому усложнению методики [129, 195]. Sinar et al. предлагали модель геморрагического инсульта, реализуемую через вводимый в область хвостатого ядра микробаллон, который затем раздували до 50 мкл с помощью рентгеноконтрастного вещества. При этом успешно удавалось воспроизводить отек головного мозга, но потенциально значимые эффекты присутствия крови и сгустка в данной модели не могут быть оценены [118]. Руководствуясь тем, что расширение гематомы и

последующий вазогенный отек связаны с избыточными концентрациями коллагеназы, высвобождающейся из поврежденных клеток, была разработана и внедрена модель геморрагического инсульта, основанная на ее введении в головной мозг. Метод, предложенный Rosenberg et al. основан на введении 2 мкл раствора, содержащего 0,01–0,1 Ед бактериальной коллагеназы в область левого хвостатого ядра [163]. Кровоизлияние в этой модели регистрировалось уже спустя 10 минут после инъекции, а расширение гематомы наблюдалось в диапазоне от 1 до 4 часов [128, 163]. В дальнейшем, принцип модели остался прежним, менялись объем и длительность инфузии коллагеназы, а также области инъекции; корректировка параметров процедуры привела к повышению точности модели [95, 161]. Моделирование геморрагического инсульта с помощью инъекции коллагеназы считается более приемлемым, так как вслед за первой фазой повреждения, относительно успешно воспроизводимой и в моделях с аутологичной кровью, действие коллагеназы обеспечивает повреждение гематоэнцефалического барьера и последующий отек [129]. Ключевая отличительная особенность данной модели – изменения, возникающие в мозге опытных животных при ее воспроизведении согласуются с изменениями, отмечаемыми в ткани мозга человека, перенесшего геморрагический инсульт [113, 129]. Принимая во внимание тот факт, что основной причиной геморрагического инсульта является артериальная гипертензия, оправданными с точки зрения патогенеза и патоморфоза могут служить модели ЦВБ, вызванные как постоянным повышенным давлением, так и гипертензивными кризами. Все методики, моделирующие гипертензивную энцефалопатию можно условно разделить на две группы: химически индуцируемые и не связанные с введением препаратов [14, 134]. Срыв ауторегуляции мозгового кровообращения расценивается на сегодняшний день как универсальный ответ на резкое повышение давления и характерен как для человека, так и для разнообразных млекопитающих [14, 159]. В индуцируемых химически моделях гипертензивной энцефалопатии

используются различные биологически активные препараты: адреналин, норадреналин, ангиотензин- II, бикикулин и другие. Явным недостатком подобных моделей можно считать необходимость использования концентраций препаратов, значительно превышающих их специфическое медиаторное действие на сосуды головного мозга, что необходимо для достижения срыва ауторегуляции и повреждения гематоэнцефалического барьера [14, 72]. В последние годы все более активно применяется модель вазогенного отека и когнитивных нарушений сосудистого генеза у крыс SPSHR (stroke-prone spontaneously hypertensive rats, спонтанно гипертензивные крысы, склонные к инсульту). Для SPSHR-линии крыс описано развитие энцефалопатии, неврологического дефицита, моторных нарушений, множественных геморрагий в различных отделах головного мозга и выраженный отек [72, 103].

Большинство экспериментальных исследований ЦВБ проводят на небольших животных: на мышах, крысах, кроликах. Использование мелких животных имеет явные преимущества - более низкую стоимость и большую этическую приемлемость. Крыса – одно из наиболее часто используемых в моделировании ЦВБ животных еще и в силу того, что сосудистая сеть головного мозга и физиология крысы схожи с таковыми у людей, а относительно небольшие размеры животного позволяют без труда мониторировать физиологические параметры, также небольшой размер мозга оптимален для забора и фиксации [14, 85, 176]. Многими авторами сообщается, что мышь является оптимальным животным для создания генетических модификаций, поэтому широко используется в трансгенных технологиях, которые позволяют оценивать молекулярную патофизиологию НМК [96, 118]. Использование монгольских песчанок в экспериментальной неврологии также обусловлено анатомическими особенностями мозгового кровообращения этих животных – разомкнутым виллизиевым кругом, отсутствием задних соединительных артерий, что дает возможность моделировать ишемию без вскрытия полости черепа путем окклюзии общих



сонных артерий [14]. Согласно рекомендациям STAIR (The initial Stroke Therapy Academic Industry Roundtable), положительный результат, достигнутый в исследовании лекарственного средства на модели одного из видов животных должен всегда проверяться у другого вида и воспроизводиться в модели постоянной и затем временной окклюзии [84]. Тем не менее, ряд аспектов существенно ограничивают возможность экстраполяции результатов, полученных в экспериментах с животными на людей. Исследования как правило проводятся на молодых животных без сопутствующей патологии. Подобное моделирование отличается от развития НМК у человека, зачастую имеющего комбинацию различных факторов риска ЦВБ. Помимо этого, разница между моделированием острых форм ЦВБ у животных и заболеванием у человека заключается еще и в скорости развития необратимых изменений соответственно изменяет терапевтическое окно и потенциал способов коррекции неврологических нарушений [85, 105].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Экспериментальные животные и моделирование цереброваскулярной болезни

Исследование проводилось на 55 крысах линии «Вистар» (ФГУП ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская область, РФ, карантин 2 недели) в возрасте 12 месяцев. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». При проведении экспериментов учитывались требования комиссии по проблеме этики отношения к животным Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук; и этические нормы, признанные мировым сообществом, и изложенные в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных». На проведение исследования получено разрешение регионального этического комитета. Экспериментальные животные были разделены на 5 групп: группа 1 - контрольные животные (n=10); группа 2 – животные с экспериментально моделируемой гипертензивной энцефалопатией (n=10); группа 3 - животные, с моделируемым стенозом общих сонных артерий (n=15); группа 4 – животные с экспериментально моделируемой гипертензивной энцефалопатией и фармакологической коррекцией С-40 (n=10); группа 5 – животные с экспериментально моделируемой гипертензивной энцефалопатией и фармакологической коррекцией глиатилином (n=10), что отражено в таблице 1.

Таблица 1. Экспериментальные группы.

№ группы	Группа эксперимента	Количество животных, n
1	Контрольные крысы	10
2	Крысы с моделируемой гипертензивной энцефалопатией	10
3	Крысы с моделируемым стенозом общих сонных артерий	15
4	Крысы с моделируемой гипертензивной энцефалопатией и фармакологической коррекцией С-40	10
5	Крысы с моделируемой гипертензивной энцефалопатией и фармакологической коррекцией глиатилином	10

Моделирование гипертензивной энцефалопатии осуществлялось путем многократных длительных воздействий отрицательных перегрузок. Для этого бодрствующих крыс со среднеактивным типом поведения помещали в пеналы, размещённые по краям горизонтальной штанги центрифуги в строго каудо-краниальном направлении и подвергали радиальному ускорению величиной 9 G в течение 5 минут дважды в день с интервалом 12 часов на

протяжении 28 дней. Данная сила и продолжительность воздействия были выбраны после серии предварительных экспериментов, по совокупности возникающих изменений (летальность, поведенческие, двигательные и когнитивные нарушения, отек головного мозга). Функциональное состояние нервной системы оценивалось непосредственно после воздействия с помощью теста McGrow в модификации Ганнушкиной. Оценку поведенческих и когнитивных функций проводили через час после гравитационного воздействия с применением стандартных психофармакологических тестов: «открытое поле», «условная реакция пассивного избегания», «экстраполяционное избавление», «радиальный восьмилучевой лабиринт», «крестообразный лабиринт». К 28-м суткам эксперимента у животных на основании стойкого повышения балла неврологического дефицита и выраженного снижения мнестической и ориентировочно-исследовательской функции верифицировалась энцефалопатия.

Изучение эффективности фармакологической коррекции лекарственными средствами С-40 и глиатилином при экспериментальном моделировании гипертензивной энцефалопатии и механизмов их церебропротективного действия проводили на крысах с массой тела 220-230 гр. Этот вид животных рекомендован Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств и общепринят для данного этапа доклинических исследований. Количество животных, включённых в исследование, было достаточным для полноценной оценки и интерпретации изучаемых эффектов и соответствует рекомендациям, изложенным в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Приготовление субстанций для введения животным происходило *ex tempore* в соответствии с протоколами. В качестве растворителя использовали очищенную воду. Субстанцию С40 или препарат глиатилин вводили внутривентрикулярно в течение 2 недель в дозах 9 мг/кг и 100 мг/кг соответственно. Первое введение осуществляли через 14 дней после

первого и продолжали до последнего эпизода воздействия на крыс отрицательного продольного ускорения в каудо-краниальном векторе (всего 15 раз).

На 29-е сутки животных выводили из эксперимента с применением в качестве наркоза хлоралгидрата (400 мг/кг, интраперитонеально), декапитировали гильотинным методом («Гильотина для крыс» АЕ0702, производитель «Open Science»), получали образцы головного мозга. Образцы головного мозга животных фиксировали в 10%-ом растворе формалина, приготовленном на 0,2mM фосфатном буфере с дальнейшей гистологической проводкой и изготовлением серийных парафиновых срезов толщиной 5 мкм., которые окрашивали по стандартным методикам гематоксилином и эозином, тионином по Нисслию [25, 35, 44].

Стеноз общих сонных артерий моделировался путем частичного ограничения кровотока с помощью наложения лигатур. В первой серии эксперимента (n=5) наркотизированное животное (хлоралгидрат, интраперитонеально, 400 мг/кг) фиксировали, область шеи выбривали, обрабатывали раствором хлоргексидина биглюконата 0,05%. Затем проводили разрез кожи по срединной линии шеи, рассекали подкожную фасцию, слюнную железу отодвигали, выделяли сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально - грудино-ключично-сосцевидной мышцей и медиально - грудино-подъязычной мышцей. Далее выделяли сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом, который орошали 2% раствором лидокаина. После выделения сонной артерии под нее подводили три лигатуры, располагаемые на расстоянии 2-3 мм друг от друга. Параллельно артерии закрепляли иглу (29G 1/2) от шприца (SFM Hospital Products GmbH, Германия), к которой привязывалась сонная артерия и которая затем убиралась таким образом, чтобы лигатуры оставались на заданном расстоянии. В результате описанных выше манипуляций кровотока по сонным

артериям ограничивался в головном мозге на 40-45% от изначальных значений. Оценку уровня локального мозгового кровотока (ЛМК, у.е.) осуществляли до и после стенозирования сонной артерии в двух точках, в месте сразу после наложения лигатур и в проекции средней мозговой артерии. Регистрацию проводили с помощью лазерного доплерографа (Biopac Systems, Inc., США). Доступ к артерии создавался следующим образом: наркотизированному животному с использованием депиляционного крема удалялся шерстяной покров и кожный лоскут в верхней поверхности черепа, которая в последствие скальпировалась. Далее с учетом стереотаксических координат, началом которых принималась точка брегма, определялось место установки датчика (в проекции средней мозговой артерии), голова животного и датчик фиксировались в стереотаксической установке, трепанационное отверстие производилось конической зуботехнической фрезой. После операции животных выводили из эксперимента передозировкой хлоралгидрата (800 мг/кг внутривенно). Таким образом, было установлено, что ограничение кровотока по сонным артериям приводит к значительному снижению мозгового кровотока, который не восстанавливается в течение 80 минут. В дальнейший эксперимент (вторая серия) брались животные (n=10), которым проводились аналогичные описанным выше мероприятия по ограничению кровотока, но его регистрацию для визуализации и последующей стандартизации стеноза осуществляли только в сонных артериях. После чего рану послойно ушивали, обрабатывали 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата и 5% раствором йода, животных переносили в домашние клетки. Через 20 дней после операции психоневрологическое состояние животных оценивалось в следующих тестах: «удержание на вращающемся стержне», «открытое поле», распознавание нового объекта и в тесте «защитной реакции закапывания стеклянных шариков». Оценка двигательной активности проводилась в «норковой» модификации установки «Открытое поле». Тест распознавания нового объекта проводился на следующие сутки после габитуации животных

в «Открытом поле». Эксперимент проходил в две сессии, разделённые 24-часовым интервалом, каждая сессия включала 10-минутные этапы ознакомления с объектами и распознавания нового объекта. На 22-е сутки животные выводились из эксперимента с применением в качестве наркоза хлоралгидрата (400 мг/кг, интраперитонеально), декапитировали гильотинным методом («Гильотина для крыс» AE0702, производитель «Open Science»), получали образцы головного мозга. Образцы головного мозга животных фиксировали в 10%-ом растворе формалина, приготовленном на 0,2mM фосфатном буфере с дальнейшей гистологической проводкой и изготовлением серийных парафиновых срезов толщиной 5 мкм. которые окрашивали по стандартным методикам гематоксилином и эозином, тионином по Нисслию [25, 35, 44].

## **2.2. Методы качественного и количественного исследования**

Выведение из эксперимента и получение образцов головного мозга осуществлялось с применением в качестве наркоза хлоралгидрата (400 мг/кг, интраперитонеально), декапитировали гильотинным методом («Гильотина для крыс» AE0702, производитель «Open Science»). Головной мозг извлекали из черепа полностью и разрезали во фронтальной плоскости: первая линия разреза – на уровне -1,72 относительно брегмы, вторая – на уровне -6,72, третьим разрезом отделяли мозжечок со стволом мозга [149]. Образцы головного мозга животных фиксировали в 10%-ом растворе формалина, приготовленном на 0,2mM фосфатном буфере с дальнейшей гистологической проводкой и изготовлением серийных парафиновых срезов толщиной 5 мкм, которые окрашивали по стандартным методикам гематоксилином и эозином, для выявления хроматофильного вещества в перикарионах нейронов срезы окрашивали тионином по методу Ниссля [25, 35, 44].

На фронтальных срезах головного мозга с помощью модуля Image Analysis программы ZEN 1.1.2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) определяли морфометрические показатели: абсолютные - среднюю площадь

перикарионов пирамидных нейронов, среднюю площадь ядер пирамидных нейронов, среднюю площадь цитоплазмы пирамидных нейронов, ширину пирамидного слоя; относительные - удельную площадь (УП) перикарионов нейронов и нейропиля. Степень выраженности процессов повреждения определяли методом подсчета удельного количества (УК) пирамидных нейронов с признаками повреждения [2, 19]. К признакам повреждения относили гиперхроматоз ядра и цитоплазмы, гиперхроматоз в сочетании со сморщиванием перикариона, хроматолиз, клетки-тени [20]. Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа «Axio Lab. A1» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105 color» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). При оценке фронтальных срезов в каждой экспериментальной группе изучали не меньше 8 срезов от каждой интересующей зоны гиппокампа и исследовали не меньше 120 полей зрения ( $0,022 \text{ мм}^2$ ) на уровне очагов с максимально выраженными изменениями. Абсолютные и относительные параметры оценивали на выборках, включающих не менее 100 клеток [2, 19].

Для иммуногистохимического исследования изготовленные парафиновые срезы (5 мкм) подвергали депарафинизации. Высокотемпературную демаскировку антигенных детерминант проводили с помощью нагревания срезов в 10 мМ растворе высокощелочного фосфатного буфера (pH 9,0) (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) при 98 С в течение 30 минут с последующим за этим охлаждением при комнатной температуре в течение 20 минут. В качестве промывочного буфера использовали 20 % TBS IHC Wash Buffer with Tween 20 (Cell Marque, USA). Для блокирования эндогенной пероксидазы применяли 3 % раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Cell Marque, USA). С целью определения экспрессии различных антигенов в качестве первичных антител использовали поли- и моноклональные антитела к соответствующим белкам (Таблица 2). В соответствии с рекомендуемыми протоколами фирм производителей подбирали рабочее разведение первичных антител, время, а также условия инкубации.



Иммуногистохимическое исследование проводили непрямым пероксидазно-антипероксидазным методом с применением моноклональных и поликлональных антител против: индуцибельной (iNOS, 1:100, экспозиция антител 1 час,) и эндотелиальной (eNOS, 1:50, экспозиция антител 1 час) нитрооксидсинтаз; кислого глиального фибриллярного белка (GFAP, 1:100, экспозиция антител 1 час); белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (HSP70, 1:100, экспозиция антител 1 час) и 90 кДа (HSP90, 1:100, экспозиция антител 1 час); сериновой рацемазы (Serine racemase, 1:50, экспозиция антител 1 час); Вах (1:1500, экспозиция антител 1 час); Bcl-2 (1:100, экспозиция антител 1 час); белка, ассоциированного с мембраной лизосом (LAMP-2, 1:100, экспозиция антител 1 час); ВН-3-белка beclin 1 (1:100, экспозиция антител 1 час). В качестве визуализирующей системы использовали полимерную систему UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). В качестве хромогена использовали 1 % раствор 3,3-диаминобензидина (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). Затем препараты докрашивали гематоксилином Карацци (БиоВитрум, Россия) и заключали в монтирующую среду (Bio-Mount, Bio-Optica, Italy). В соответствии с протоколами фирм изготовителей при определении экспрессии первичных антител использовали позитивные контроли. Негативным контролем служили срезы с экспериментальным материалом, на которые наносили дилуент (Cell Marque, USA), но не наносили первичные антитела.

Таблица 2. Панель используемых иммуногистохимических маркеров

Название	Клон/№ по каталогу	Фирма, страна производитель	Разведение	Демаскировка	Время и условия инкубации
Сериновая рацемаза	Mouse monoclonal IgG <sub>1</sub> sc-365217	Santa-Cruz Biotechnology, Inc., USA	1:50	термическая обработка	2 часа, влажная камера
HSP-70	Ab-2 (w27) mouse Mab MS-482-P	Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:100	термическая обработка	1 час, влажная камера, комнатная температура
GFAP	Ab-6 (ASTR06)		Ready to use	нет	
nNOS	EP1855Y GTX61671	GeneTex, Inc.	1:100	термическая обработка	24 часа, влажная камера, температура, +4..+8 <sup>0</sup> С
Beclin-1	GTX3770		1:100	термическая обработка	1 час, влажная камера, комнатная температура
HSP-90	Mouse Monoclonal, MA3-010	Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:100	термическая обработка	1 час, влажная камера, комнатная температура
iNOS	GTX15323	Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:100	термическая обработка	20 минут, влажная камера, комнатная температура
Bcl-2	Mouse monoclonal/anti-human clone 124	Dako, Denmark	1:100	термическая обработка	1 час, влажная камера

## Окончание таблицы 2

Название	Клон/№ по каталогу	Фирма, страна производитель	Разведение	Демаскировка	Время и условия инкубации
LAMP-2	Rat monoclonal MA5-17861	Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:100	термическая обработка	1 час, влажная камера, комнатная температура
BAX	mouse monoclonal IgG1 sc-20067	Santa-Cruz Biotechnology, Inc., USA	1:1500	Термическая обработка	2 часа, влажная камера, комнатная температура
AIF	mouse monoclonal IgG2b sc-13116	Santa-Cruz Biotechnology, Inc., USA	1:100	термическая обработка	1 час, влажная камера, комнатная температура
Caspase-3	GTX24051	GeneTex, Inc. Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:100	термическая обработка	24 часа, влажная камера, температура, +4..+80 С
eNOS	GTX50892	GeneTex, Inc. Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:50 Ready to use	термическая обработка	2 часа, влажная камера, комнатная температура

### 2.3. Статистическая обработка и анализ данных

Описание количественных признаков и статистический анализ данных в полученных выборках проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководствах [15, 42]. Возможные ошибки и артефакты в экспериментальных данных обнаруживали с помощью Q-теста, если объем

выборки был меньше 12, или по методу трех сигм, в случае больших выборок. Проверка соответствия выборочных распределений нормальному проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилка. При описании параметров выборки центральную тенденцию характеризовали с помощью медианы (Me), которая при малом объеме выборки и отклонениях одномодального распределения от нормального в наилучшей степени соответствует генеральному среднему. Для оценки вариабельности показателей указывали интерквартильный размах (Q1-Q3), где Q1 – 25 процентиль, Q3 – 75 процентиль. Различия между выборками проверяли путем попарного сравнения выборок с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney, U-test) [15, 42]. Все статистические расчеты проводили с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows 6,0 фирмы StatSoft, Inc (USA).

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **3.1. Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии**

#### **3.1.1. Структурно-функциональные изменения в гиппокампе крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии**

У животных контрольной группы в составе гиппокампа определялись в зависимости от плотности расположения нервных клеток, их размеров и ветвления аксонов и дендритов 4 поля (CA1-CA4). Микроскопически гиппокамп имел характерную цитоархитектонику. Доминирующими клеточными элементами являлись нейроны пирамидного слоя (*stratum pyramidale*), которые в CA1 располагались более компактно, по сравнению с CA2 - CA4 (Рисунок 1). Краевой слой (*stratum oriens*) гиппокампа представлял собой узкий относительно бесклеточный слой. Радиальный (*stratum radiatum*) и молекулярный слои (*stratum moleculare*) состояли в основном из дендритов пирамидных нейронов. При окраске гематоксилином и эозином у животных в составе пирамидного слоя встречались многочисленные нейроны с треугольной формой цитоплазмы перикарионов, с выраженной базофилией цитоплазмы, ядра этих клеток также отличались умеренно выраженной гиперхромией, содержали центрально расположенное или эктопированное ядрышко в кариоплазме. Кровеносные сосуды (артериолы, венулы, капилляры) визуализировались во всех слоях гиппокампа. Стенка капилляров образована эндотелиоцитами с уплощенными темными ядрами, лежащими на базальной мембране. Зубчатая извилина (*gyrus dentata*) визуализировалась в виде компактной полоски мелких (гранулярных) нейронов. Зубчатая извилина также характеризовалась нормальной цитоархитектоникой с определяемыми подслоями.

У контрольных животных при гистологическом исследовании четко визуализируются все слои гиппокампа всех зон. Зона CA1 пирамидного слоя имеет характерную цитоархитектонику и состоит преимущественно из компактно расположенных перикарионов полигональной формы среднего

размера. В большинстве перикарионов четко визуализируется крупное ядро, ядрышко и цитоплазма. Среди пирамидных клеток зоны CA1 встречаются клетки с гиперхромией цитоплазмы и единичные клетки-тени (Рисунок 1). Количество нейронов с признаками повреждения составило в этой зоне 14,9 % [11,3;16,9] в левом полушарии и 8,2 % [6,8;9,7] в гиппокампе правого полушария (Таблица 3). Средняя площадь перикариона нейрона в зоне CA1 левого гиппокампа составила 107,6 мкм<sup>2</sup> [95,4;115,5], в правом гиппокампе - 97,5 мкм<sup>2</sup> [91;103,7], что соответствует имеющимся в литературе данным по межполушарной асимметрии в данной зоне. Средняя площадь ядра перикариона в данной зоне составила для левого и правого гиппокампа соответственно 70,1 мкм<sup>2</sup> [59,8;82,5] и 76,3 мкм<sup>2</sup> [66,5;83] (Таблица 3). Для пирамидного слоя зоны CA1 характерно наиболее плотное расположение тел нейронов и наиболее высокий показатель удельной плотности перикарионов – в левом гиппокампе 45,3 % [41,6;48,5], в правом 33,3 % [31,3;41]. Сосуды микроциркуляторного отдела определялись во всех слоях зоны CA1, капилляры представляли собой тонкостенные сосуды с однослойным эндотелием, центрально расположенным уплощенным ядром, смещенным к базальной мембране. В некоторых сосудах выявлялись эритроцитарные стазы и явления гемолиза эритроцитов. Нейропилъ пирамидного слоя CA1 представлен отростками пирамидных нейронов, отростками астроцитов краевого и молекулярного слоев, а также единичными микроглиальными клетками (Рисунок 1). Stratum oriens имеет характерный клеточный состав и представлен, главным образом, аксонами пирамидных нейронов, корзинчатыми нейронами и клетками макро- и микроглии. Striatum moleculare содержит большее количество микроглиальных клеток и множественные ветвящиеся дендриты пирамидных нейронов.

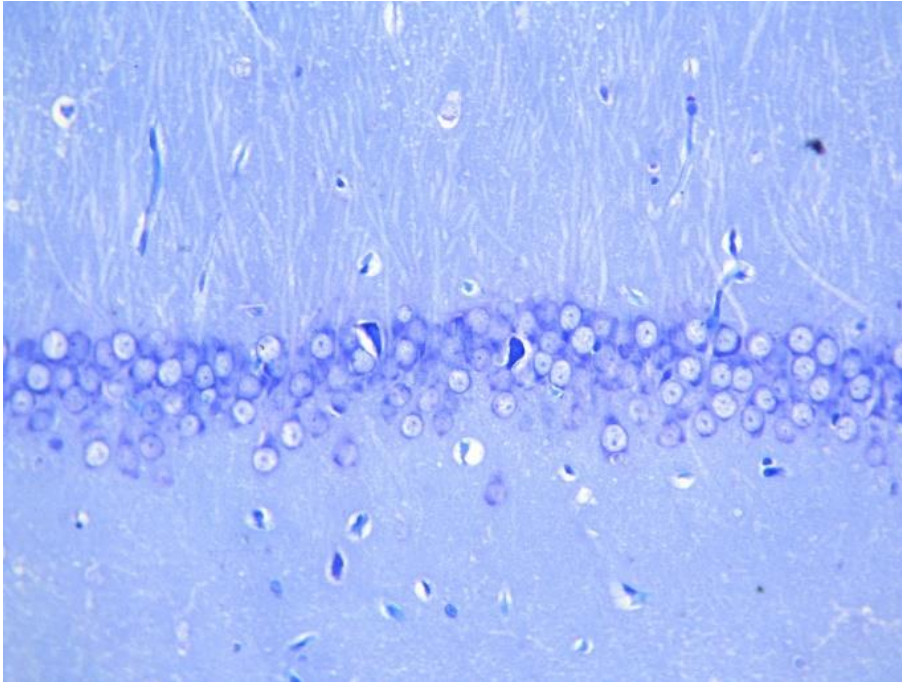


Рисунок 1. Гистологическое строение СА1 гиппокампа контрольных крыс. УвХ100, окраска тионином по методу Ниссля.

Пирамидный слой зоны СА2 гиппокампа контрольных животных построен из перикарионов нейронов и нейропиля, включающего астроцитарные отростки, микроглиальные клетки и аксональные отростки пирамидных клеток (Рисунок 2). В большинстве клеток четко определялось крупное ядро, овальное ядрышко и цитоплазма. В нейрональном составе встречались немногочисленные клетки с гиперхромией цитоплазмы, клетки-тени и единичные гипохромные клетки. Количество поврежденных нейронов (гиперхромные, клетки-тени, нейроны со сморщенным перикарионом) составило в СА2 левого гиппокампа 6,8 % [4,9;8,2], в СА2 правого гиппокампа 6,8 % [4,5;8,9] (Таблица 3). Средний размер перикариона в данной зоне – в левом гиппокампе  $94,4 \text{ мкм}^2$  [87,3;102,2], в правом -  $89,6 \text{ мкм}^2$  [82,4;94,4]. Удельная плотность нейронов в левом гиппокампе составила 39 % [29,0;43,4], в правом 34,5 % [31;37,7]. Средний размер ядра пирамидных нейронов в зоне СА2 -  $62,1 \text{ мкм}^2$  [59,1;70,8] для левого гиппокампа,  $72,3 \text{ мкм}^2$  [55,6;77,7] для правого. В краевом и молекулярном слоях СА2 характерное строение, без

особенностей в клеточном составе и сосудах микроциркуляторного русла (Рисунок 2).

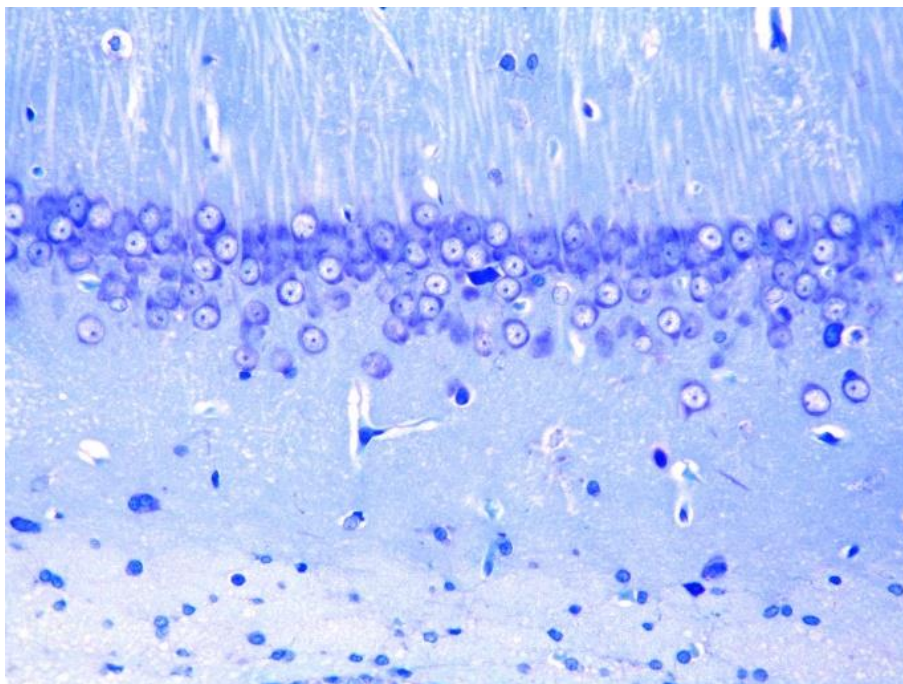


Рисунок 2. Гистологическое строение СА2 гиппокампа контрольных крыс. УвХ100, окраска тионином по методу Ниссля.

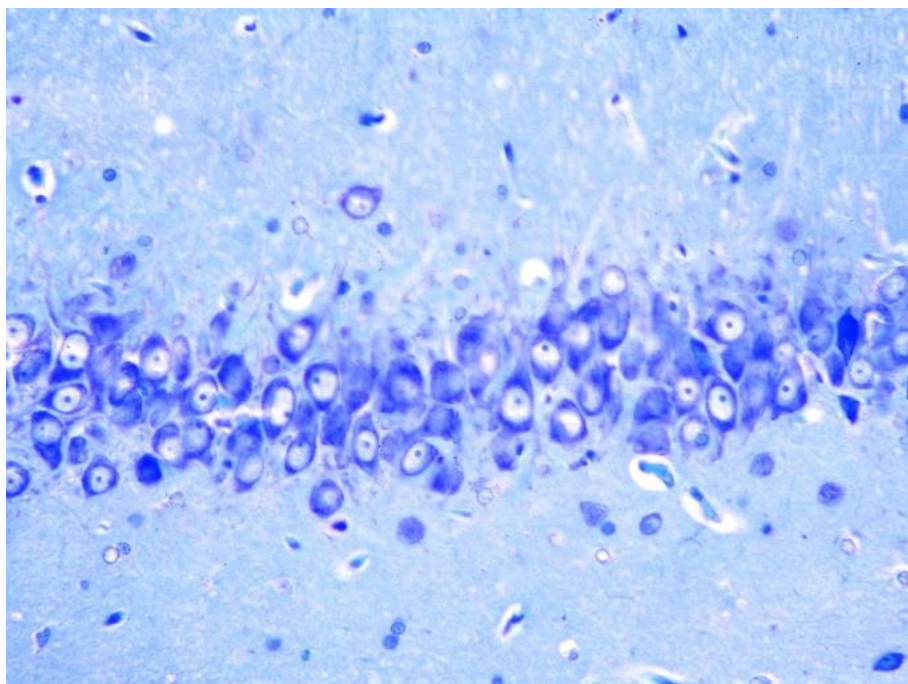


Рисунок 3. Гистологическое строение СА3 гиппокампа контрольных крыс. УвХ100. Окраска тионином по методу Ниссля.



В пирамидном слое зоны СА3 при гистологическом исследовании выявлены крупные редко расположенные нейроны, средний размер перикарионов которых составил 118,2 мкм<sup>2</sup> [99,4;129,6] в левом гиппокампе и 120,2 мкм<sup>2</sup> [110,3;142,3] в правом. Средние размеры ядер пирамидных нейронов составили, соответственно, для левого и правого гиппокампа 78,3 мкм<sup>2</sup> [64,4;91,8] и 89,4 мкм<sup>2</sup> [77,6;108,8]. Перикарионы пирамидных нейронов в данной зоне характеризовались крупной пирамидной (треугольной) формой с четко визуализируемым ядром и ядрышком, равномерно окрашенной цитоплазмой. Среди нейронального состава пирамидного слоя выявлялось умеренное количество клеток с признаками повреждения в гиппокампе левого полушария и единичные клетки в правом. Морфометрический подсчет клеток со сморщенными перикарионами, гиперхроматозом цитоплазмы, а также клеток-теней выявил в левом гиппокампе 13,5 % [9,5;16,3] и 6,3 % [4,6;9] в правом (Таблица 3). Обращает на себя внимание менее плотное расположение нейронов пирамидного слоя СА3 по сравнению с зонами СА1 и СА2, которое определялось как визуально, так и подтверждалось морфометрически (Рисунок 3). Удельная плотность нейронов в пирамидном слое СА3 слева составила 39,5 % [31,1;46,3] и 33,8 % [30,1;37,5] справа. Нейропиль СА3 представлен в пирамидном слое крупными аксональными отростками, отростками астроцитов, а также клетками микроглии (Рисунок 3).

При гистологическом исследовании СА4 зоны гиппокампа выявлено характерное для данной зоны строение – пирамидный слой составляли редко расположенные полиморфные клетки, большинство из которых имели полигональную форму перикариона, среди которых как в левом полушарии, так и в правом определялись единичные тотально гиперхромные нейроны с измененной формой перикариона и извитостью отростков (Рисунок 4). Так, в пирамидном слое СА4 гиппокампа левого полушария количество нейронов с признаками повреждения составило 6,4 % [4,0;8,3], а в правом - 4,4 % [2,9;7,0] (Таблица 3). Средний размер перикарионов зоны СА4 составил в левом гиппокампе 149,5 мкм<sup>2</sup> [137,7;171,3] и 111,9 мкм<sup>2</sup> [100,5;122,6] в правом.

Средние размеры ядер пирамидных нейронов составили в левом и правом гиппокампе соответственно  $89,3 \text{ мкм}^2$  [77,7;96,2] и  $88,9 \text{ мкм}^2$  [81,3;94].

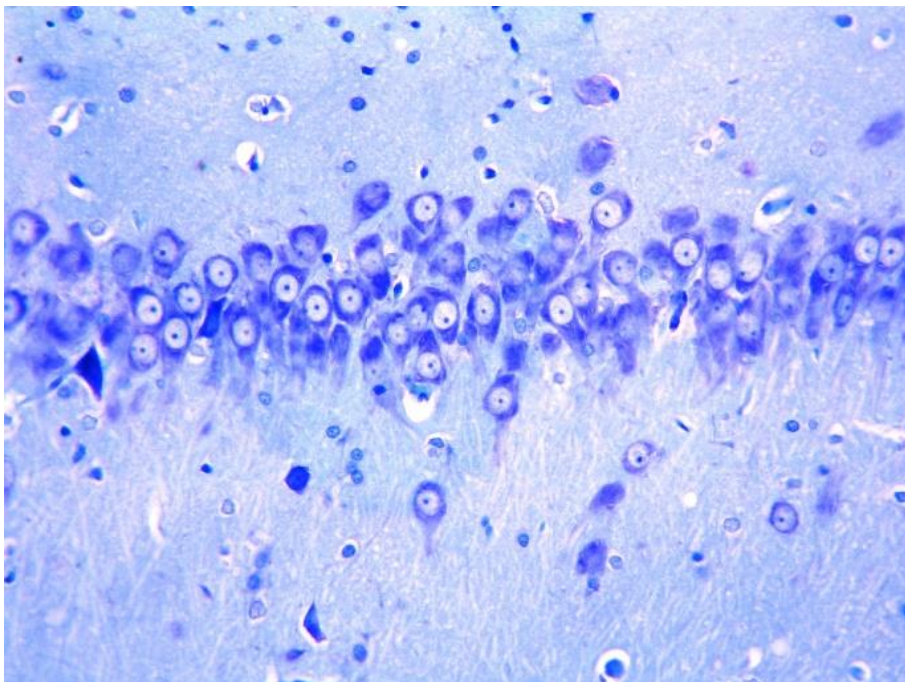


Рисунок 4. Гистологическое строение СА4 гиппокампа контрольных крыс. УвХ100. Окраска тионином по методу Ниссля.

В зоне СА4 по сравнению с остальными зонами гиппокампа интактных животных обнаружено наиболее высокая относительная площадь нейропиля в пирамидном слое. Так, удельная плотность перикарионов пирамидных нейронов в гиппокампе левого полушария данной зоны составила 38,9 % [31,5;42,2], а в гиппокампе правого 28,6 % [22,4;30,7] (Таблица 3). Гораздо менее компактное расположение нейронов в зоне СА4 по сравнению с другими зонами определяется визуально, между перикарионами в пирамидном слое располагаются множественные отростки астроцитарных клеток, микроглиальные элементы и дендриты пирамидных клеток. Краевой и молекулярный слои СА4 зоны составлены в основном из нейроглии, причем в молекулярном слое доминирует микроглия (Рисунок 4).

Таблица 3. Морфометрические показатели пирамидного слоя гиппокампа контрольных крыс

Параметр	Левый гиппокамп				Правый гиппокамп			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Удельное количество нейронов с признаками повреждения, %	14,9 [11,3;16,9]	6,8 [4,9;8,2]	13,5 [9,5;16,3]	6,4 [4,0;8,3]	8,2 [6,8;9,7]	6,8 [4,5;8,9]	6,3 [4,6;9]	4,4 [2,9;7,0]
Средняя площадь перикариона нейрона, мкм <sup>2</sup>	107,6 [95,4;115,5]	94,4 [87,3;102,2]	118,2 [99,4;129,6]	149,5 [137,7;171,3]	97,5 [91;103,7]	89,6 [82,4;94,4]	120,2 [110,3;142,3]	111,9 [100,5;122,6]
Средняя площадь ядра нейрона, мкм <sup>2</sup>	70,1 [59,8;82,5]	62,1 [59,1;70,8]	78,3 [64,4;91,8]	89,3 [77,7;96,2]	76,3 [66,5;83]	72,3 [55,6;77,7]	89,4 [77,6;108,8]	88,9 [81,3;94]
Средняя площадь цитоплазмы, мкм <sup>2</sup>	36,1 [34;48,8]	32,8 [25,1;39,4]	38,9 [31,3;46,6]	59,4 [51,2;65,3]	20,8 [15,8;27,1]	17,6 [14,9;22,6]	30,9 [26,2;41,3]	22,5 [14,9;26,4]
Удельная плотность перикарионов, %	45,3 [41,6;48,5]	39 [29,0;43,4]	39,5 [31,1;46,3]	38,9 [31,5;42,2]	33,3 [31,3;41]	34,5 [31;37,7]	33,8 [30,1;37,5]	28,6 [22,4;30,7]
Удельная плотность нейропила, %	54,7 [49,2;59]	61 [53,7;66,8]	60,5 [54,5;63,8]	61,1 [52,7;69,3]	66,7 [60,1;71]	65,5 [55,8;69,7]	66,2 [61;73,5]	71,4 [63,4;79,6]

Окончание таблицы 3

Параметр	Левый гиппокамп				Правый гиппокамп			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,8 [0,6;0,9]	0,6 [0,5;0,8]	0,7 [0,6;0,8]	0,6 [0,5;0,8]	0,5 [0,4;0,7]	0,5 [0,4;0,6]	0,5 [0,3;0,6]	0,4 [0,3;0,6]
Ширина пирамидного слоя, мкм	44,3 [41,4;47,9]	47,1 [42,5;55,3]	55,8 [50,2;60,3]	50,2 [45,5;53,7]	41,2 [37,8;46,9]	42 [38,1;47,8]	57,3 [51,8;62,3]	45,3 [42,2;49,2]
Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	1,9 [1,7;2]	1,9 [1,7;2,1]	2 [1,8;2,1]	1,5 [1,4;1,6]	3,7 [3,5;3,8]	4,1 [3,9;4,4]	2,9 [2,8;3,1]	4 [3,7;4,1]

У крыс, подвергавшихся гравитационному воздействию в зоне СА1 прежде всего обращает на себя внимание картина спонгиоза, формирующаяся за счет выраженного отека, который локализовался как вокруг сосудов микроциркуляторного русла, так и вокруг нейронов и глиальных клеток (Рисунок 5). Выраженность отека носила одинаковый характер как в гиппокампе левого, так и правого полушарий головного мозга. Во всех слоях СА1 зоны гиппокампа экспериментальных животных выявлялись резкие нарушения кровообращения в микроциркуляторном отделе. В сосудах капиллярного типа наблюдалось полнокровие, формирование эритроцитарных стазов с гемолизом, очаговые диапедезы эритроцитов, преимущественно в полиморфном и молекулярном слоях. В стенках сосудов микроциркуляторного русла наблюдалось плазматическое пропитывание, в отдельных сосудах отмечена деструкция базальной мембраны. В пирамидном слое СА1 наряду с выраженным отеком наблюдалось резкое изменение цитоархитектоники (Рисунок 5). Обнаруживалось значительное число пирамидных нейронов с признаками повреждения. Визуально пирамидные нейроны располагались менее компактно, чем в контрольной группе, обнаруживались фрагменты очаговых выпадений нейронов. Ширина пирамидного слоя СА1 гиппокампа левого полушария составила 49,8 [46,1;54,1] мкм, и не имела достоверных отличий от контроля. Дистрофические изменения в пирамидных клетках носили разную выраженность, заключались в резком увеличении числа гиперхромных нейронов, причем в большинстве из них наблюдалась тотальная гиперхромия ядра и цитоплазмы, образовывались клетки-тени. Наблюдалась значительная неоднородность в форме и размерах перикарионов пирамидных клеток. Появлялось большое количество клеток, в которых наряду с тотальной гиперхромией наблюдалось веретеновидное сморщивание с сохранением контуров перикариона, отмечалась патологическая извитость отростков нейронов (Рисунок 5). В немногочисленных сохранных нейронах четко определялось округлое ядро и ядрышко, встречались единичные

двудыршковые нейроны. Прежде всего обращает на себя внимание резкое увеличение количества нейронов с признаками повреждения в СА1. В гиппокампе левого полушария количество нейронов с признаками повреждения увеличилось на 59,7 % ( $p < 0,01$ ) (Рисунок 9), в правом количество поврежденных нейронов увеличилось на 65,5 % ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 10). В отдельных полях зрения СА1 представляла собой гомогенизированную полосу, состоящую сплошь из темных нейронов, большинство из которых имели деформированные перикарионы (Рисунок 5). Выявлено уменьшение средних размеров ядер нейронов в левом гиппокампе на 11,4 мкм<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ), в гиппокампе правого полушария средний размер ядер нейронов не имел достоверных отличий от контрольной группы. При этом средний размер перикарионов пирамидных нейронов СА1 достоверно изменялся в гиппокампе обоих полушарий – в левом увеличился на 3,1 мкм<sup>2</sup> ( $p < 0,01$ ), а в правом снизился на 15,8 мкм<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ) (Таблица 4). Определяемое визуально менее компактное расположение пирамидных нейронов в СА1 подтверждалось достоверным уменьшением значений относительной плотности перикарионов. В правом гиппокампе снижение составило 8,2 % ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 12), а в левом относительная плотность перикарионов снизилась еще более значительно – на 20,6 % ( $p < 0,01$ ) (Рисунок 11). При гистологическом исследовании СА2 обнаружены схожие дистрофические и деструктивные изменения, однако они носили несколько более выраженный характер. Так, степень гиперхромии нейронов оставалась сопоставимой с СА1, при этом число пикноформных клеток и клеток-теней было выше (Рисунок 6). Присущая пирамидным нейрона СА1 извитость отростков наблюдалась и в СА2. Ширина пирамидного слоя в гиппокампе левого полушария увеличилась на 11,1 мкм ( $p < 0,01$ ), а в гиппокампе правого увеличилась на 10,1 мкм ( $p < 0,01$ ). В данной зоне число пирамидных нейронов с признаками повреждения увеличивалось в гиппокампе левого полушария на 68% ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 9), а в правом полушарии на 77% ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 10).

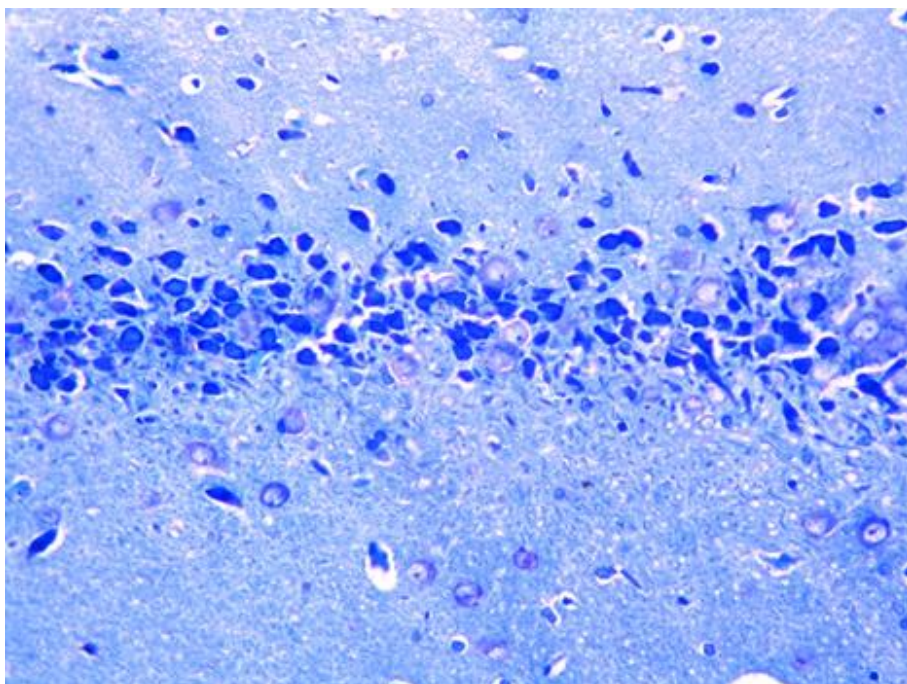


Рисунок 5. Гистологическое строение СА1 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. Резкое увеличение числа пирамидных нейронов с признаками повреждения. УвХ100. Окраска тионином по методу Ниссля.

Сморщивание нейронов СА2 подтверждалось морфометрически значительным уменьшением средних размеров перикарионов на  $34,5 \text{ мкм}^2$  ( $p < 0,01$ ). Вместе с этим, наблюдалось уменьшение средних размеров ядер пирамидных нейронов в гиппокампе левого полушария на  $24,7 \text{ мкм}^2$  (Таблица 4). Зоны очаговых выпадений нейронов и разреженность в расположении перикарионов пирамидного слоя, наблюдаемые при качественном исследовании также подтверждались морфометрическим подсчетом – как в левом, так и в правом гиппокампе обнаруживалось снижение удельной плотности перикарионов пирамидных нейронов и увеличение удельной плотности нейропиля за счет глиального компонента и выраженного перицеллюлярного и периваскулярного отека. В СА2 гиппокампа левого полушария показатель удельной плотности перикарионов снизился на 14% ( $p < 0,01$ ) (Рисунок 11), а в гиппокампе правого полушария снижение составило 6,3% ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 12). Сосудистые изменения проявлялись в резком полнокровии и очаговых диапедезных кровоизлияниях с явлениями деструкции стенок сосудов микроциркуляторного русла. Данные нарушения

наблюдались в пирамидном слое гиппокампа, молекулярном слое и слое полиморфных клеток, где перицеллюлярный отек локализовался вблизи тел корзинчатых нейронов и глиальных клеток (Рисунок 6).

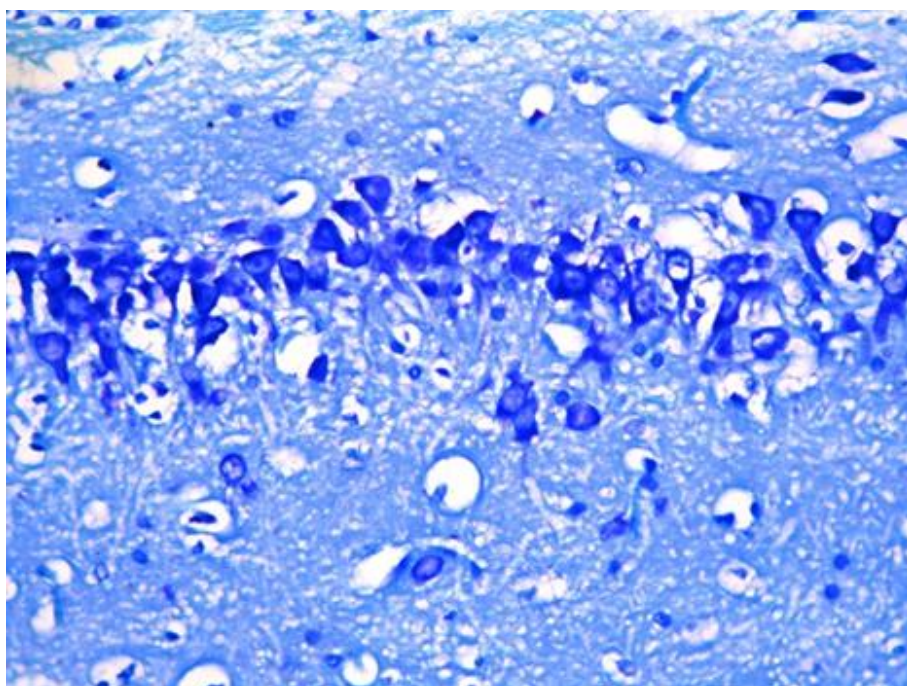


Рисунок 6. Гистологическое строение СА2 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. Увеличение количества нейронов с признаками повреждения на фоне перицеллюлярного и периваскулярного отека. УвХ100 Окраска тионином по методу Ниссля.

В СА3 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией схожие изменения – картина спонгиоза в связи с выраженным перицеллюлярным и периваскулярным отеком, выявляемым во всех слоях гиппокампа, сосудистые нарушения в виде полнокровия, очаговых эритроцитарных диапедезов и плазматического пропитывания стенок сосудов. Дистрофические изменения пирамидных нейронов с приобретением ими веретеновидной или близкой к веретеновидной формы, резкая гиперхромия ядра и цитоплазмы с множеством тотально гиперхромных клеток (Рисунок 7). В отдельных полях зрения гомогенизация пирамидного слоя со сплошными темными нейронами, патологическая извитость отростков. Ширина пирамидного слоя СА3 в гиппокампе левого полушария увеличилась на 8,1 мкм ( $p < 0,01$ ) (Таблица 4). Число пирамидных нейронов с признаками повреждения возросло в СА3 гиппокампа левого полушария на 63,3%



( $p < 0,01$ ) (Рисунок 9), а в правом еще значительно – на 80,4% ( $p < 0,01$ ) (Рисунок 10). Картина спонгиоза и дистрофические изменения перикарионов пирамидных нейронов обуславливают снижение удельной плотности пирамидных нейронов в левом гиппокампе на 15,7% ( $p < 0,01$ ) (Рисунок 11), в правом на 5,9% ( $p < 0,01$ ) (Рисунок 12). Снижение значений средней площади перикарионов пирамидных нейронов составило 18,1  $\mu\text{м}^2$  ( $p < 0,01$ ) в левом гиппокампе и 20,5  $\mu\text{м}^2$  ( $p < 0,01$ ) в правом (Таблица 4).

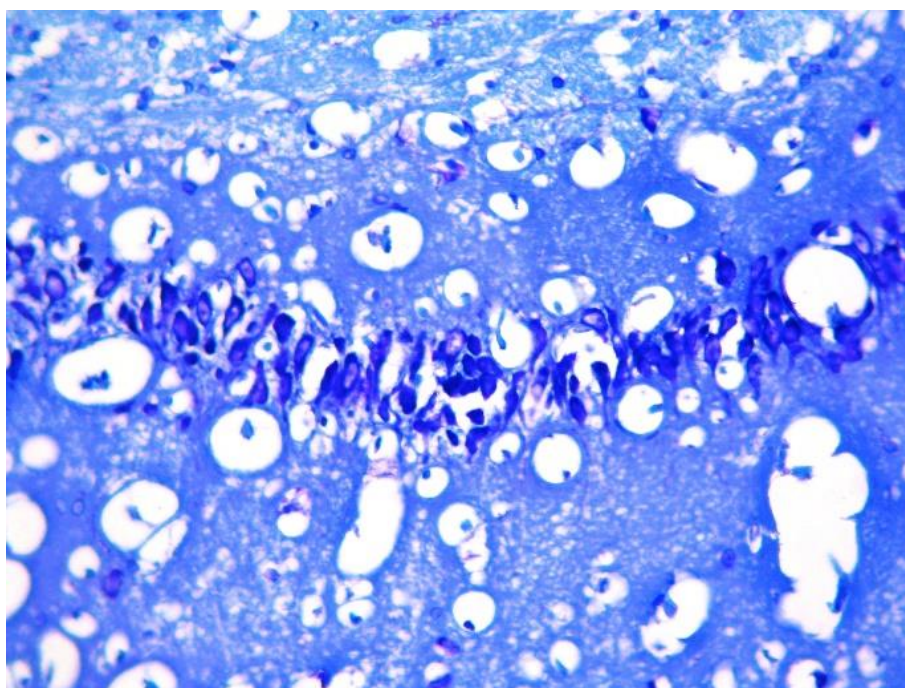


Рисунок 7. Гистологическое строение СА3 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. Нарушение цитоархитектоники СА3, выраженный спонгиоз. УвХ100 Окраска тионином по методу Ниссля.

В СА4 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией при качественном исследовании сохраняется картина выраженного отека и микроциркуляторных нарушений. Данные изменения носили визуально одинаковый характер как в левом, так и в правом гиппокампе. Ширина пирамидного слоя СА4 увеличилась в гиппокампе левого полушария на 7,6  $\mu\text{м}$  ( $p < 0,001$ ), в правом достоверных отличий не обнаружено. Среди поврежденных нейронов доминировали гиперхромные в сочетании с деформацией перикариона, встречались отдельные клетки-тени (Рисунок 8). Удельное количество пирамидных нейронов с признаками повреждения в гиппокампе левого полушария увеличилось на 64,6% (Рисунок

9) и на 72,1% в правой полушарии (Рисунок 10). Для СА4 было характерно самое выраженное среди всех зон уменьшение значений средних площадей перикариона и ядра пирамидных нейронов. В левом гиппокампе средняя площадь перикариона и ядра пирамидных нейронов снизилась, соответственно на 52,9 мкм<sup>2</sup> (p<0,01) и 40,7 мкм<sup>2</sup> (p<0,001); в то время как в правом гиппокампе значимо снизился только показатель средней площади ядра – на 24,8 мкм<sup>2</sup> (p<0,01) (Таблица 4). Характерное для других зон более рыхлое расположение и очаговые выпадения нейронов наблюдались и в СА4 (Рисунок 8). Показатель удельной плотности перикарионов пирамидных нейронов снизился в левом гиппокампе на 11,1% (p<0,01). В stratum oriens наблюдался отек, локализованный вокруг компонентов нейропиля, а также гиперхромия корзинчатых нейронов, и деформация их перикарионов.

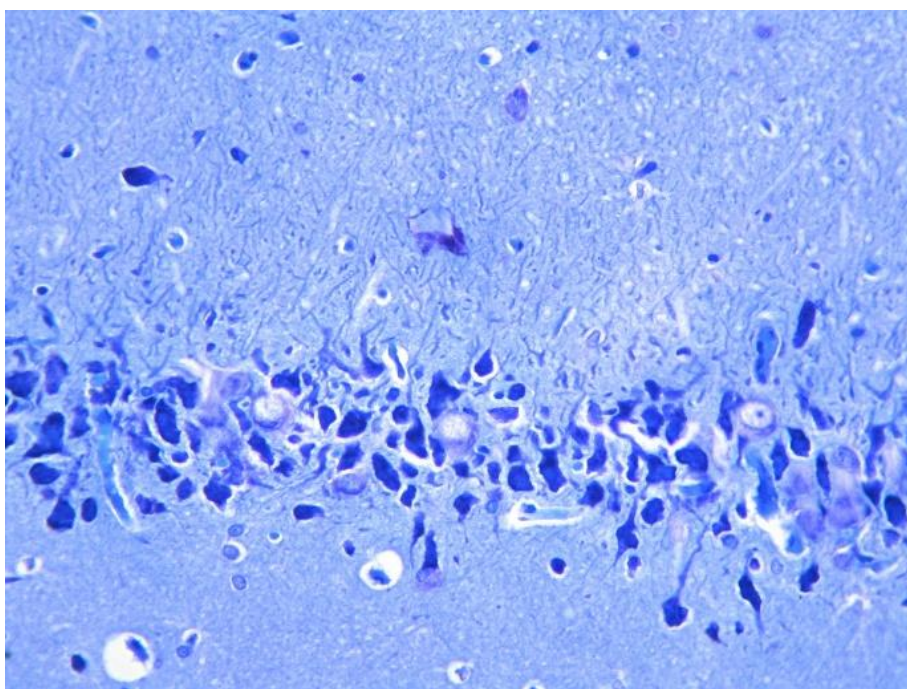


Рисунок 8. Гистологическое строение СА4 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. Увеличение количества пирамидных нейронов с признаками повреждения. УвХ100 Окраска тионином по методу Ниссля.

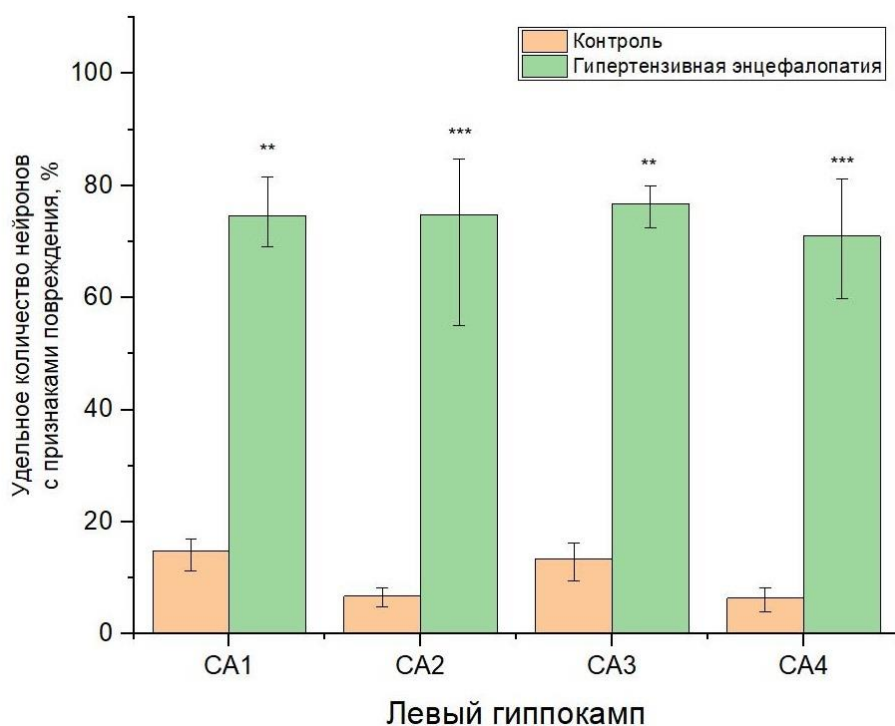


Рисунок 9. Динамика изменения удельного количества нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое гиппокампа левого полушария крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \*\* - ( $p < 0,01$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

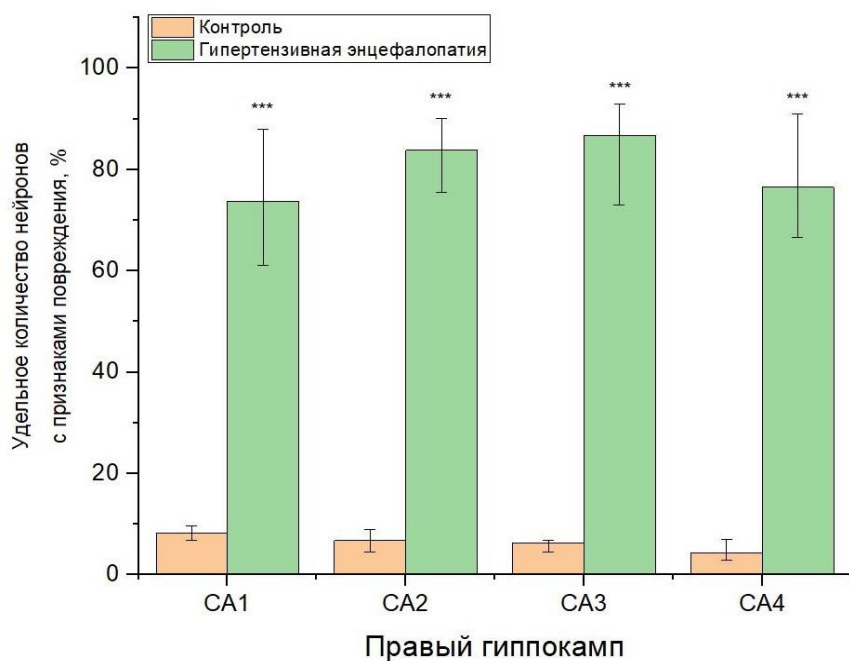


Рисунок 10. Динамика изменения удельного количества нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое гиппокампа правого полушария крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \*\*\* - ( $p < 0,001$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

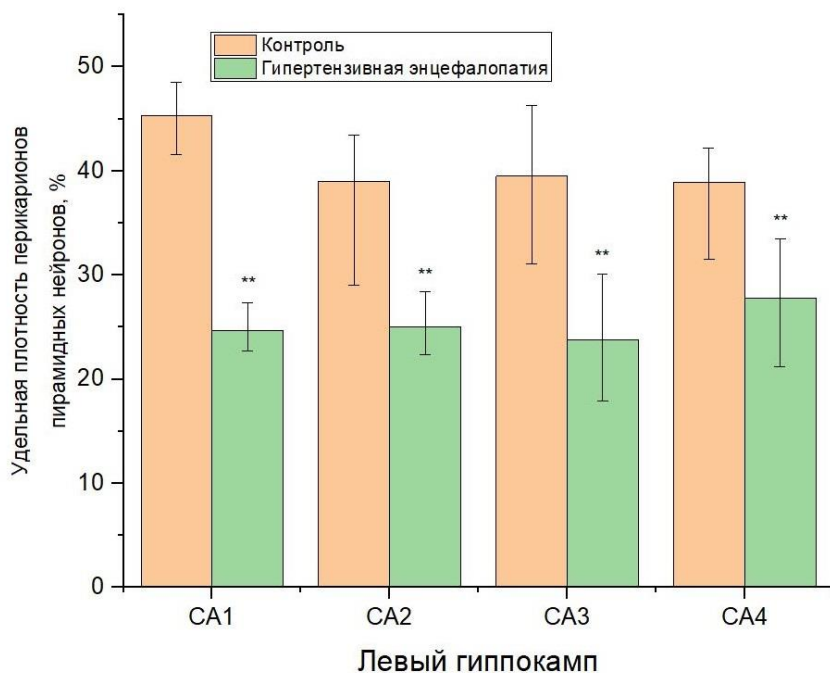


Рисунок 11. Динамика изменения удельной плотности перикарионов пирамидных нейронов в пирамидном слое гиппокампа левого полушария крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \*\* - ( $p < 0,01$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

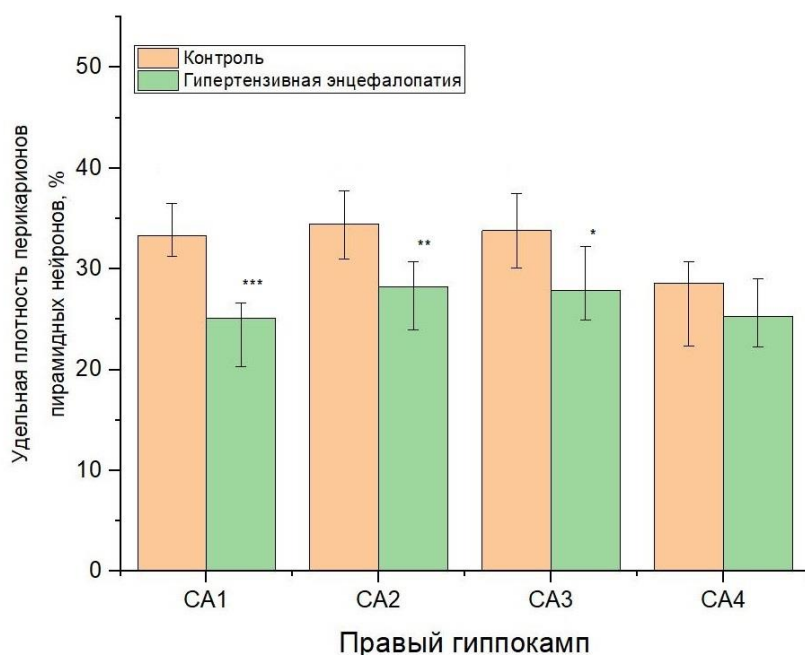


Рисунок 12. Динамика изменения удельной плотности перикарионов пирамидных нейронов в пирамидном слое гиппокампа правого полушария крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* - ( $p < 0,05$ ), \*\* - ( $p < 0,01$ ), \*\*\* - ( $p < 0,001$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

Таблица 4. Морфометрические показатели пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией

Параметр	Левый гиппокамп				Правый гиппокамп			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Удельное количество нейронов с признаками повреждения, %	74,6 [69,3;81,5]**	74,8 [55,0;84,81]***	76,8 [72,5;79,9]**	71 [58,8;81,1]***	73,7 [61,3;88]***	83,8 [75,5;90]***	86,7 [73;92]***	76,5 [66,6;91]***
Средняя площадь перикариона нейрона, мкм <sup>2</sup>	110,7 [98,8;119,4]**	59,9 [56,8;81,5]***	100,1 [85,5;116,2]**	96,6 [79,9;111,8]**	81,7 [77,7;90,7]*	79,5 [73,7;91]	99,7 [91,1;112]**	99,9 [93,7;116,6]
Средняя площадь ядра нейрона, мкм <sup>2</sup>	58,7 [46,6;67,7]*	37,4 [34;49,8]***	64,3 [55,72;74,8]**	48,6 [38,8;70,1]***	59,9 [56,6;74,1]	60 [56,6;67,3]	65,5 [61;88,7]	64,1 [58;75,3]**
Средняя площадь цитоплазмы, мкм <sup>2</sup>	53,5 [43;62,4]	22,8 [17,3;27,7]*	36,2 [27,1;47,8]	47,7 [36,5;54,9] *	22 [14,7;29,1]	20,1 [14,3;30,8]	34,8 [23,6;45,2]	36,1 [25,5;44,2]
Удельная плотность перикарионов, %	24,7 [22,7;27,3]**	25 [22,4;28,4]**	23,8 [17,9;30,1]**	27,8 [21,2;33,5]**	25,1 [20,3;26,6]***	28,2 [24;30,7]***	27,9 [24,9;32,2]*	25,3 [22,3;29]
Удельная плотность нейропила, %	75,3 [70,2;79,8]**	75 [67,9;78,8]**	76,2 [71,1;80,6]**	72,2 [66,9;75,3]**	74,9 [71;77,7] ***	71,8 [70,1;74,5]***	72,1 [68,2;75]	74,7 [70,6;79,2]

Окончание таблицы 4

Параметр	Левый гиппокамп			Правый гиппокамп		
	CA1	CA2	CA1	CA2	CA1	CA2
Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,3 [0,3;0,4]**	0,3 [0,2;0,4]**	0,4 [0,3;0,4]**	0,3 [0,3;0,4]***	0,4 [0,3;0,4]***	0,3 [0,3;0,4]
Ширина пирамидного слоя, мкм	49,8 [46,1;54,1]	58,2 [55,8;61,7]**	63,9 [61;64,8]**	43,6 [40,5;45,1]	52,1 [49,3;58,1]***	61,4 [58,6;65,9]
Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	1,1 [1;1,1]***	1,6 [1,6;1,7]**	1,8 [1,7;1,9]	2,7 [2,6;2,8]***	3 [2,9;3,1]***	1,9 [1,8;1,9]***
						1,8 [1,7;1,8]***

Примечание. \*\*\* –  $p < 0,001$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой, \*\* –  $p < 0,01$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой; \* –  $p < 0,05$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (использован критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде медианы с указанием интерквартильного размаха (Me [Q1; Q3]).

### **3.1.2. Иммунофенотипическая характеристика гиппокампа крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии**

#### **Иммуногистохимическое исследование экспрессии Hsp70 и Hsp90**

При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против Hsp70 в СА1 выявлено достоверное увеличение относительной площади ИРМ на 3,2% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольными животными (Таблица 5). Hsp70-позитивный материал характеризовался неравномерным распределением в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и носил в группе животных с моделируемой гипертензивной энцефалопатией преимущественно умеренно выраженный характер (2 балла) (Рисунок 13). При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против Hsp90 в СА1 выявлено достоверное увеличение относительной площади ИРМ на 2,7% по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 16). Преимущественная интенсивность Hsp90-позитивного материала носила в СА1 слабо выраженный характер (1 балл), в единичных пирамидных нейронах отмечена умеренная экспрессия.

Иммуногистохимическое исследование СА2 с применением антител против Hsp70 выявило достоверное увеличение относительной площади ИРМ на 3 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем (Рисунок 15). Характер экспрессии Hsp70-позитивного материала в данной зоне был схож с наблюдаемым в СА1, преобладала умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия (2 балла). В отдельных пирамидных нейронах наблюдалась цитоплазматическая пылевидная экспрессии слабой выраженности (1 балл). Анализ экспрессии Hsp90 в СА2 достоверных отличий от контрольной группы не выявил.

При иммуногистохимическом исследовании СА3 с применением антител против Hsp70 было выявлено наиболее выраженное среди всех зон увеличение относительной площади ИРМ – на 4,9% по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ) (Таблица 5). Усиление экспрессии отмечалось как в увеличении относительной площади Hsp70-позитивного материала, так и в количестве

ИРМ-позитивных нейронов, а также в интенсивности материала. Преимущественно слабая экспрессия в контрольной группе сменялась на преимущественно умеренную в пирамидных нейронах СА3 крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией (Рисунок 14).

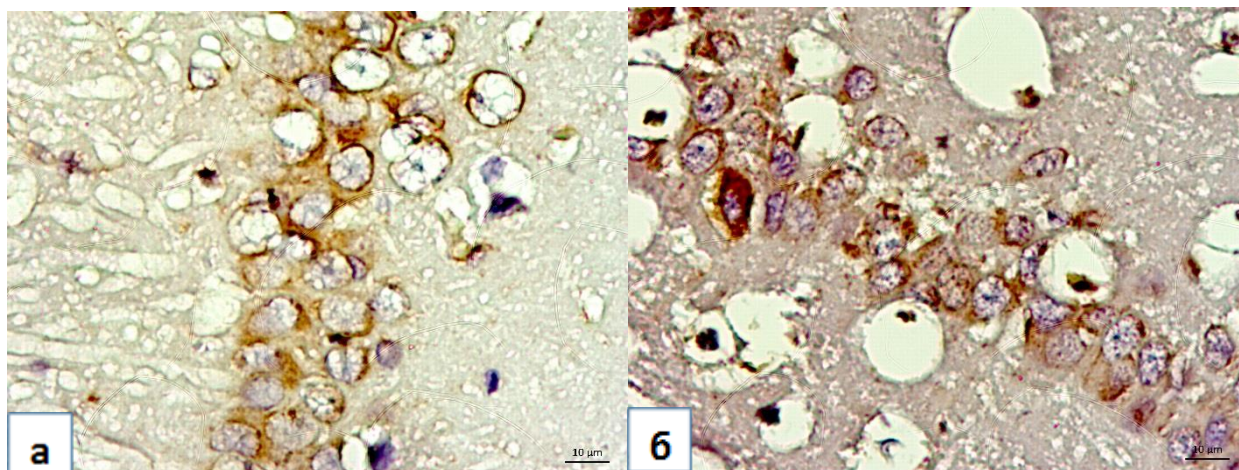


Рисунок 13. СА1 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Мелкогранулярная умеренно выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против HSP 70, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

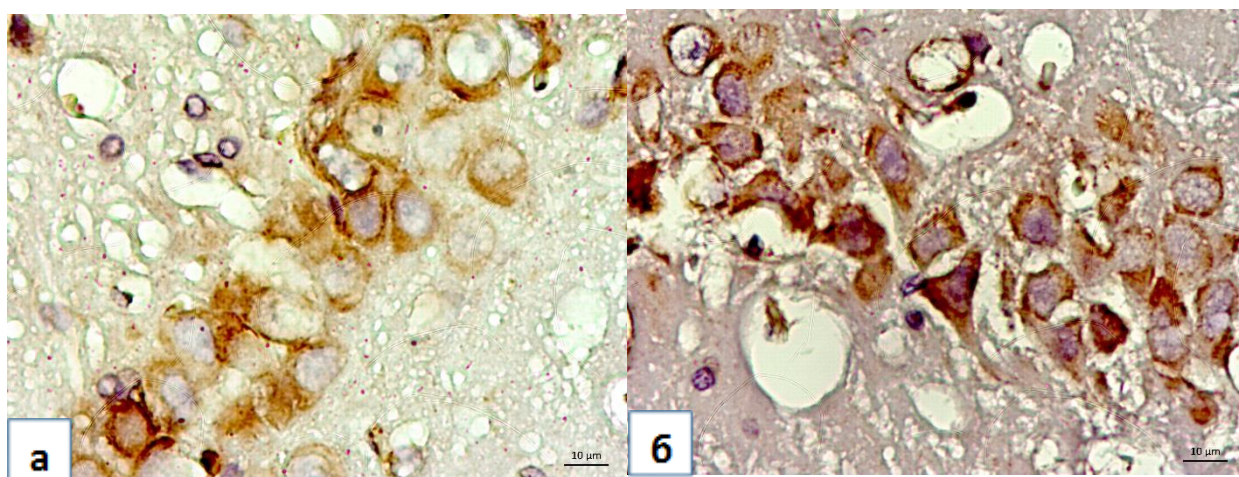


Рисунок 14. СА3 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Изменение интенсивности ИРМ на преимущественно умеренно выраженную (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против HSP 70, докраска гематоксилином. Ув. X 400



В отдельных клетках даже отмечалась экспрессия, достигавшая 3 баллов, чего не было в контрольной группе. При иммуногистохимическом исследовании СА3 с применением антител против Hsp90 достоверной разницы по сравнению с контролем не было выявлено.

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител против Hsp70 СА4 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией обнаружено увеличение относительной площади ИРМ на 2,6% по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 15).

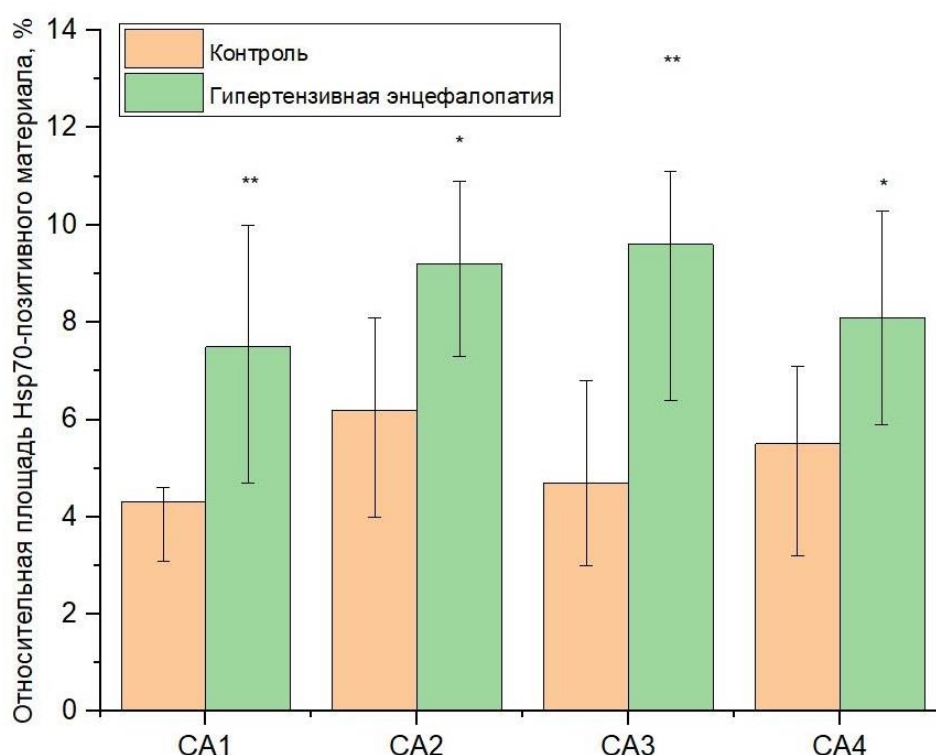


Рисунок 15. Динамика изменения Hsp70 – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* - ( $p < 0,05$ ), \*\* - ( $p < 0,01$ ), (критерий Манна-Уитни).

При этом, так же как и в остальных зонах, характер экспрессии сменялся с преимущественно слабо выраженного в контрольной группе на преимущественно умеренно выраженный в группе животных с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. При иммуногистохимическом исследовании СА4 зоны экспериментальных крыс с применением антител против Hsp90 достоверных отличий от контрольной группы выявлено не было как в относительной площади, так и в интенсивности ИРМ.

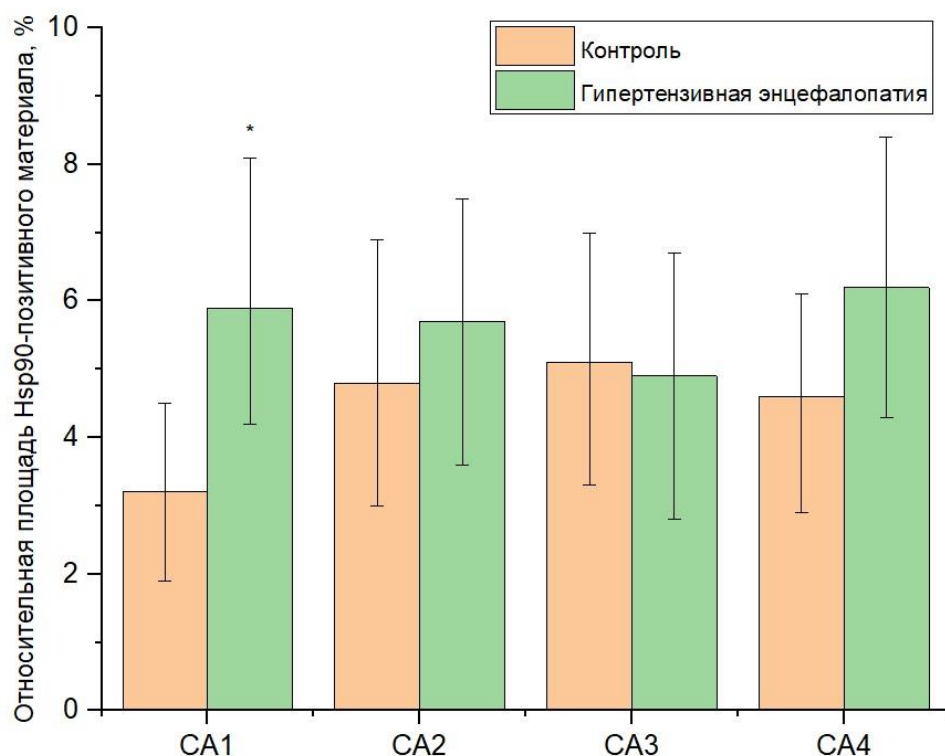


Рисунок 16. Динамика изменения Hsp90 – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* - ( $p < 0,05$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

### Иммуногистохимическое исследование экспрессии GFAP

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к кислому глиальному фибриллярному белку GFAP в пирамидном слое CA1 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией относительная площадь иммунореактивного материала составила 4,0 [3,3;5] % (Рисунок 19) и не имела достоверных отличий от контрольной группы. При этом, преобладала резко выраженная экспрессия (3 балла), в отдельных астроцитах наблюдалась умеренно выраженная экспрессия (2 балла), а также усиленное ветвление астроцитарных отростков. При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к GFAP наиболее значительное увеличение относительной площади GFAP-позитивного материала отмечено в глиальных клетках пирамидного слоя CA2 гиппокампа

крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатии – относительная площадь ИРМ увеличилась на 8,9% ( $p < 0,001$ ) и составила в данной зоне 12,9 [9,9;17,3] % (Рисунок 19). Преобладала резко выраженная экспрессия (3 балла). Характерная особенность экспрессии – на фоне выраженного отека и более рыхлого расположения пирамидных нейронов, большая часть GFAP-позитивных клеток смещались с периферии, из краевого и молекулярного слоев в центр пирамидного слоя, располагаясь непосредственно между телами пирамидных нейронов (Рисунок 17).

При исследовании СА3 пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией достоверного изменения относительной площади ИРМ выявлено не было. Однако, отмечена тенденция к увеличению экспрессии GFAP в данной зоне и более выраженный характер экспрессии в компонентах глии, достигая в большинстве астроцитов резко выраженного (3 балла) (Рисунок 19). Значение относительной площади ИРМ в СА3 составило 2,9 [2,5;3,6] %.

При иммуногистохимическом исследовании СА4 пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией экспрессия ИРМ носила умеренно выраженный (2 балла), а в части клеток – резко выраженный характер (3 балла). Показатель относительной площади ИРМ в данной зоне составил 9,2 [7,9;11,3] %, что на 6,9 % ( $p < 0,001$ ) больше, чем в контрольной группе (Таблица 5). Для GFAP-позитивных астроцитов всех зон гиппокампа крыс из группы с моделируемой гипертензивной энцефалопатией была характерна звездчатая форма с усиленным ветвлением отростков по сравнению с контролем. Кроме того, в условиях выраженного перичеселлюлярного и периваскулярного отека, присущее для СА2 и СА3 смещение GFAP-позитивных астроцитов с периферии в центр пирамидного слоя, также наблюдалось и в СА4 (Рисунок 18). Таким образом, установлено, что при моделировании гипертензивной энцефалопатии активированные астроциты концентрировались преимущественно в пирамидном слое, тогда

как в контрольной группе обнаруживались равномерно во всех слоях гиппокампа крыс.

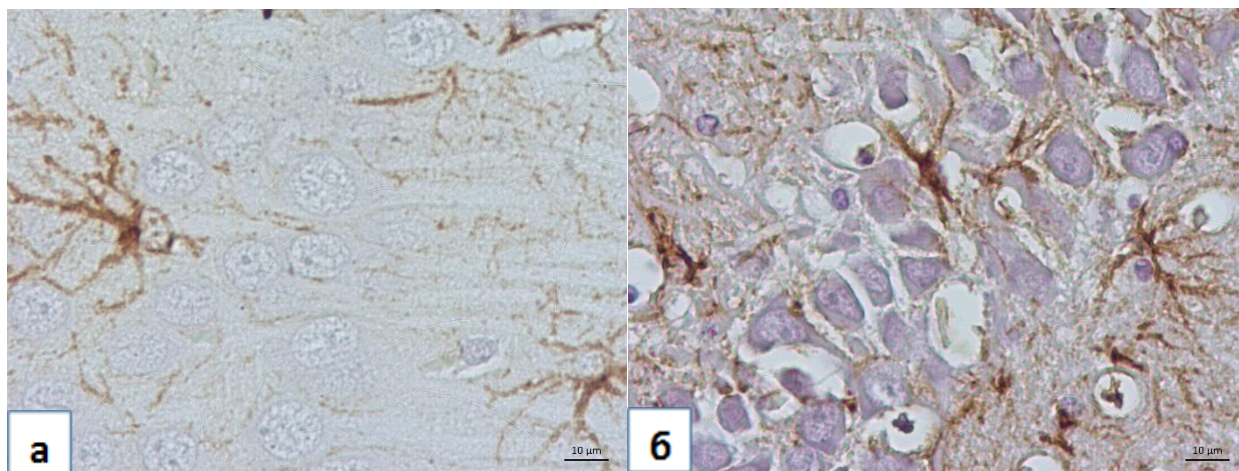


Рисунок 17. СА2 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Увеличение относительной площади ИРМ, выраженный перичеселлюлярный и периваскулярный отек, пикноморфная деформация перикарионов, а также появление тел и отростков астроцитов непосредственно между перикарионами нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

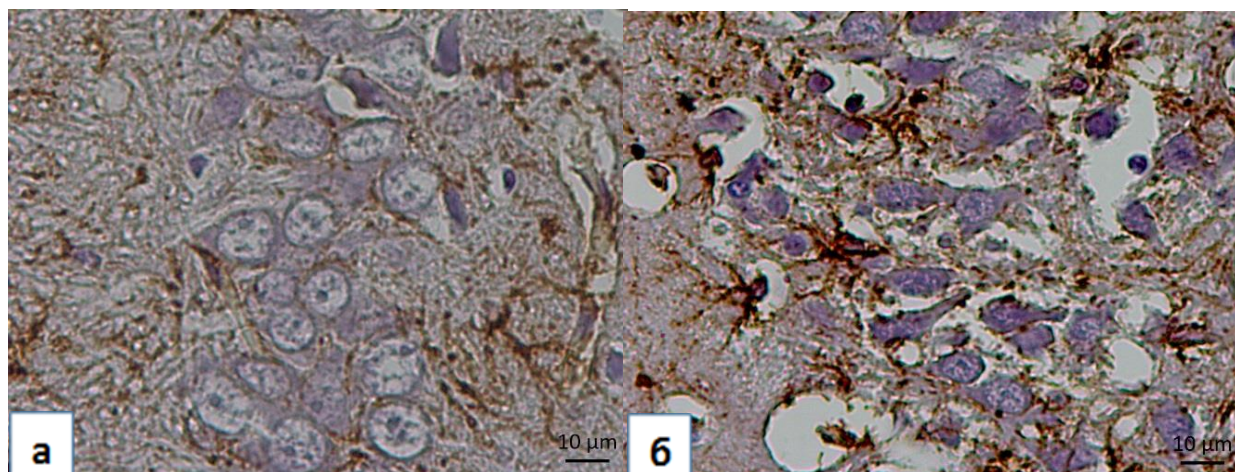


Рисунок 18. СА4 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Концентрация активированных астроцитов в пирамидном слое СА4, формирование глиального рубца (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

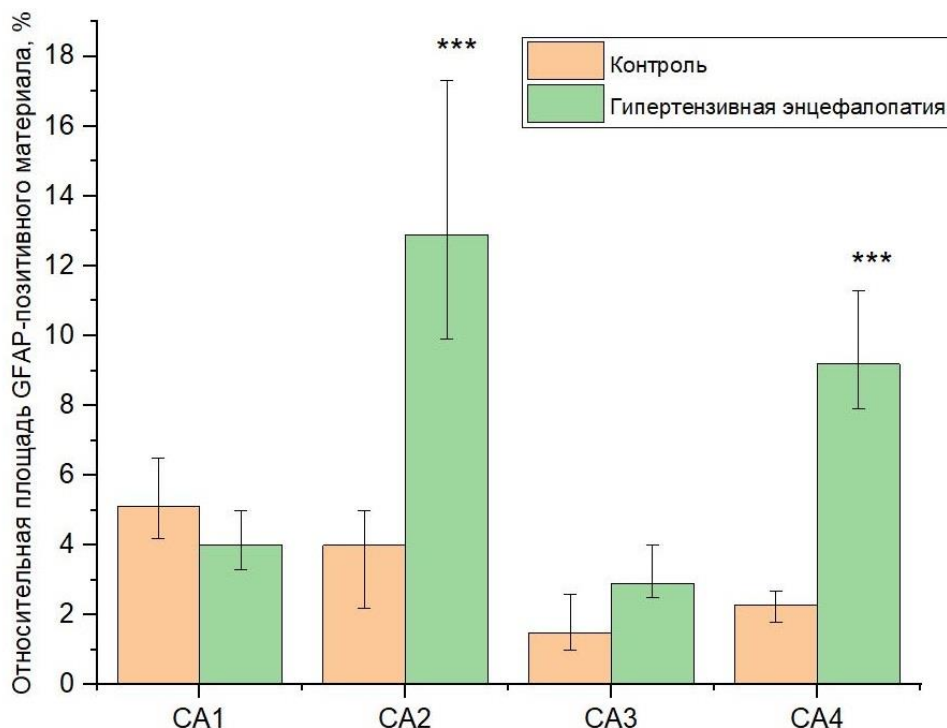


Рисунок 19. Динамика изменения GFAP – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* \* \* - ( $p < 0,001$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

### Иммуногистохимическое исследование экспрессии *beclin 1*

При иммуногистохимическом исследовании пирамидного слоя гиппокампа крыс из группы с моделируемой гипертензивной энцефалопатией с применением антител к *beclin 1* достоверное увеличение относительной площади ИРМ обнаружены в CA1 и CA2, соответственно на 1% ( $p < 0,01$ ) и 0,6% ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 21), достигнув, таким образом 1,4 [1,2;2] % и 1,5 [1,2;1,7] % (Таблица 5). Характер экспрессии сменялся с преимущественно слабо выраженного (1 балл) в контрольной группе на преимущественно умеренно выраженный (2 балла) в группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией (Рисунок 20). Следует отметить, что более яркая цитоплазматическая реакция на белок *beclin 1* определялась в нейронах

пирамидного слоя, имеющих признаки повреждения в виде веретеновидной деформации перикариона и была максимально выражена в СА1. В СА3 и СА4 достоверных отличий в значениях относительной площади ИРМ от контроля не было выявлено, однако отмечалась тенденция к усилению экспрессии.

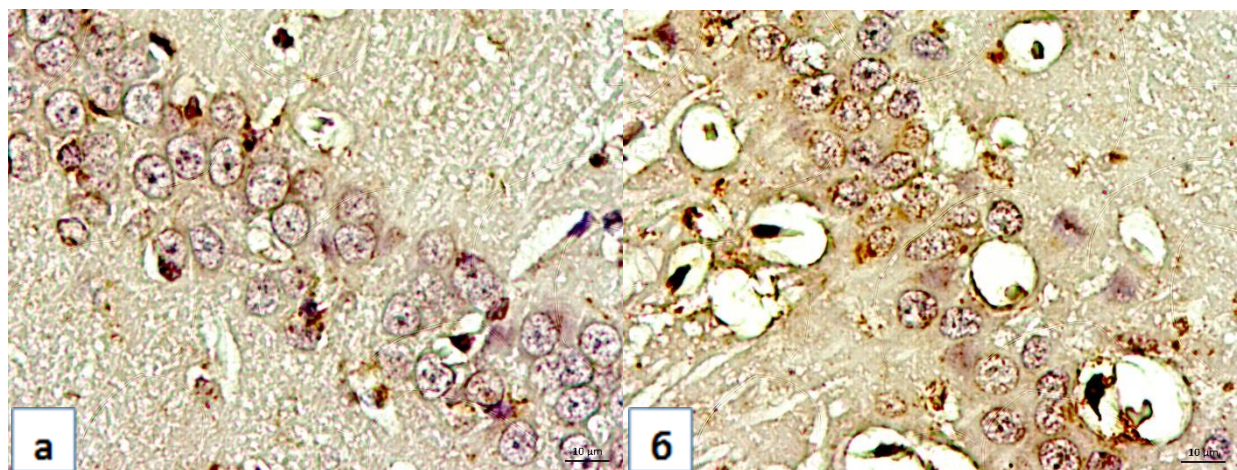


Рисунок 20. СА1 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Мелкоглобулярная цитоплазматическая преимущественно слабо выраженная экспрессия ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя СА4 (а). Появление единичных клеток со степенью экспрессии, достигающей 3 баллов (б) Иммуногистохимическое исследование, антитела против *veslin 1*, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Так, в СА3 показатель относительной площади ИРМ составил 2,3 [1,7;2,8] %, а в СА4 2,6 [2;2,8] %. При этом в пирамидных нейронах СА3 и СА4 контрольных крыс *veslin 1*-позитивный материал носил слабую экспрессию (1 балл), тогда как в группе с моделируемой гипертензивной энцефалопатией среди пирамидных нейронов СА3 и СА4 встречались с интенсивностью экспрессии до умеренно выраженной (2 балла).

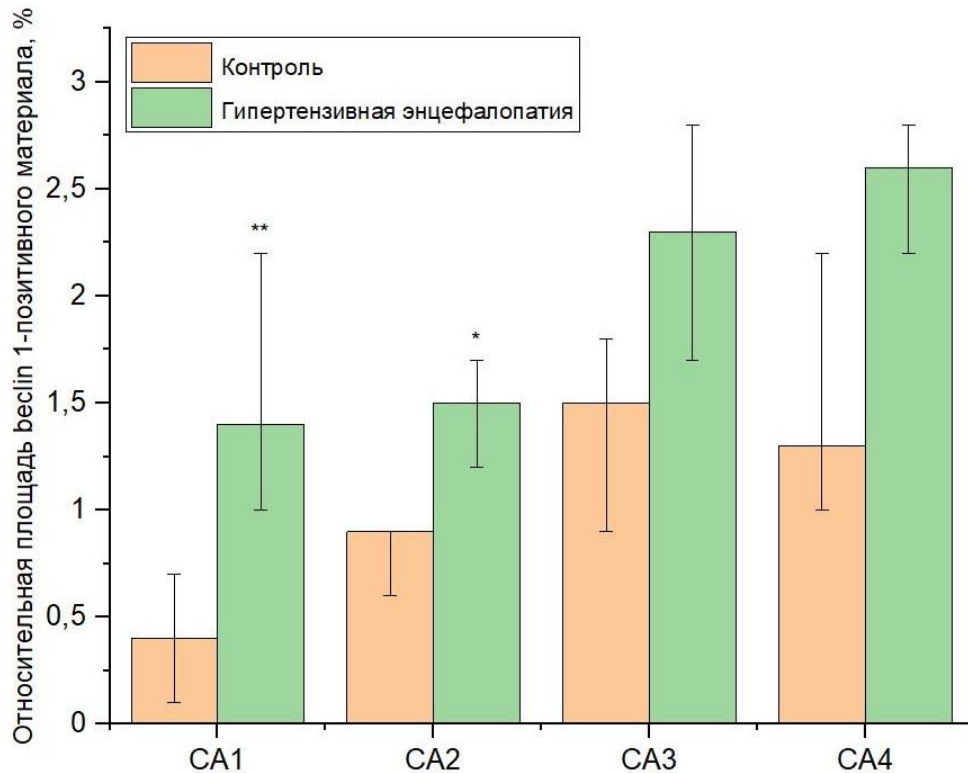


Рисунок 21. Динамика изменения beclin 1 – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* - ( $p < 0,05$ ), \* \* - ( $p < 0,01$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

### Иммуногистохимическое исследование экспрессии LAMP-2

Иммуногистохимическое исследование с применением антител к LAMP-2 выявил неоднородный характер экспрессии в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. В CA1 и CA3 пылевидная цитоплазматическая экспрессия носила преимущественно слабый характер (1 балл), с участками умеренно выраженной экспрессии (2 балла) и достоверных отличий от контрольной группы не имела как в интенсивности, так и в относительной площади ИРМ. При этом, в пирамидном слое CA1 исследуемых крыс обнаружена явная тенденция к усилению относительной площади ИРМ ( $p=0,054$ ) (Таблица 5). В пирамидном слое CA2 и CA4 гиппокампа крыс из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии выявлены достоверные отличия от контрольной группы. Для

зоны СА2 показатель относительной площади ИРМ составил 1,9 [1,3; 1,9] %, таким образом увеличившись по сравнению с контролем на 1,3% ( $p < 0,01$ ). В СА4 относительная площадь ИРМ составила 2,1% [1,7; 2,5], что на 1,5% больше по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,01$ ) (Рисунок 23). Усиление экспрессии, подтверждаемое количественно, также определялось визуально в изменении характера экспрессии с преимущественно слабого (1 балл) в контрольной группе на преимущественно умеренный (2 балла) в группе моделируемой гипертензивной энцефалопатии (Рисунок 22). Необходимо отметить, что наиболее выраженная интенсивность экспрессии LAMP-2-позитивного материала выявлялась в нейронах пирамидного слоя гиппокампа экспериментальных животных, перикарионы которых претерпевали пикноморфную деформацию.

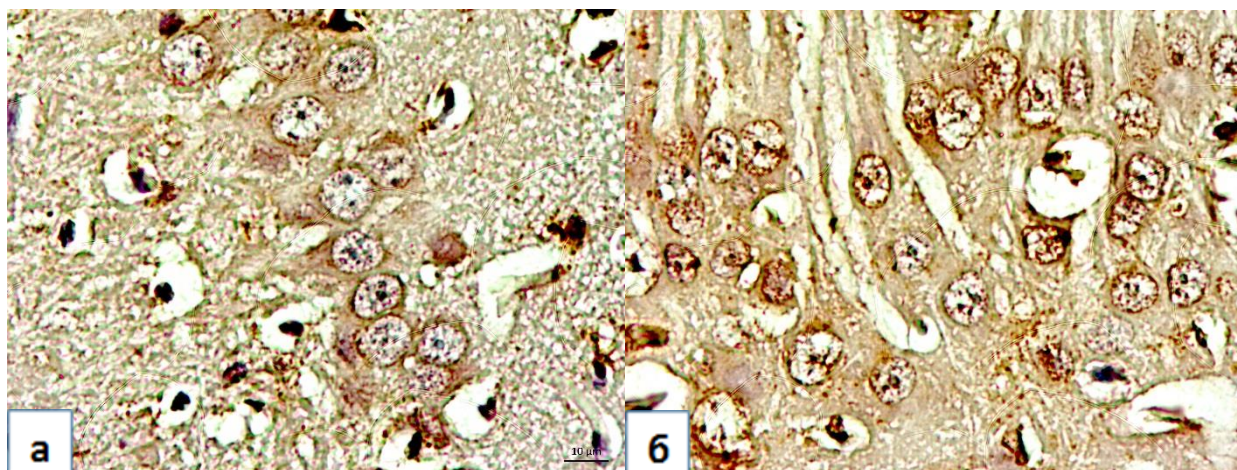


Рисунок 22. СА2 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Мелкоглобулярная витоплазматическая экспрессия ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя СА4 (а). Появление единичных клеток со степенью экспрессии, достигающей 3 баллов (б) Иммуногистохимическое исследование, антитела против LAMP-2, докраска гематоксилином. Ув. X 400



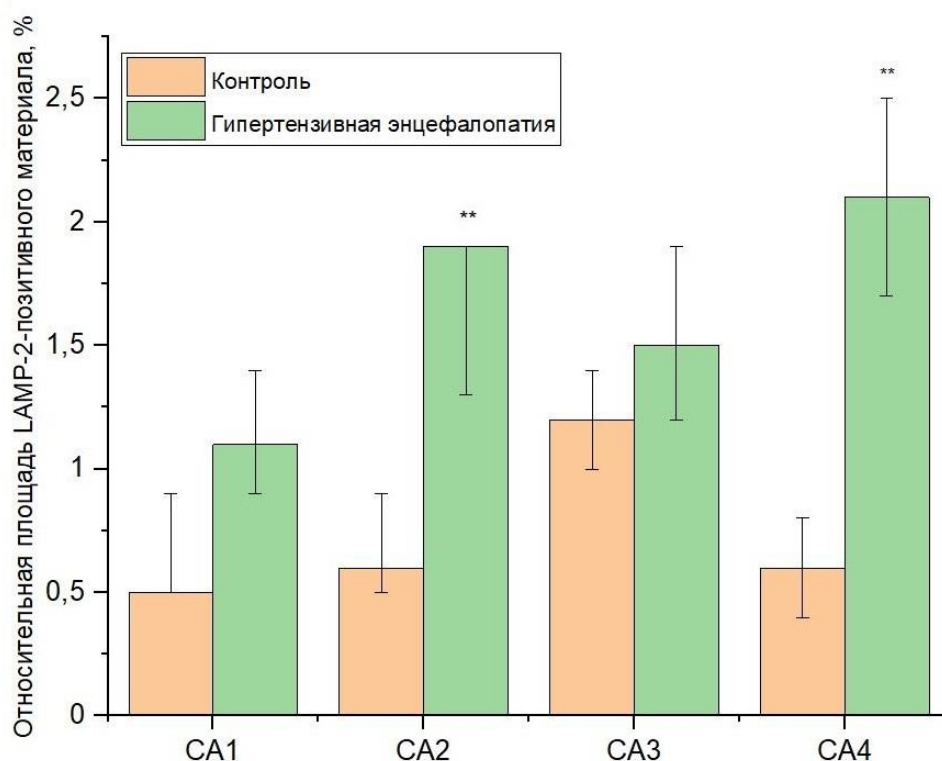


Рисунок 23. Динамика изменения LAMP-2 – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* \* - ( $p < 0,01$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

### Иммуногистохимическое исследование экспрессии bcl-2

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к bcl-2 в группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией выявлена неоднородная позитивная цитоплазматическая реакция преимущественно умеренно выраженная (2 балла). В отдельных пирамидных нейронах и глиальных клетках экспрессия носила мозаичный характер, где выявлялось как пылевидное накопление ИРМ слабой интенсивности (1 балл), так и депозиты более выраженной интенсивности (2-3 балла). Важной особенностью в характере экспрессии ИРМ у крыс с гипертензивной энцефалопатией является визуально более интенсивное окрашивание в нейронах с деформированными перикарионами на фоне выраженного отека (Рисунок 24). Усиление экспрессии bcl-2 также проявлялось в увеличении относительной площади ИРМ. В CA1 крыс исследуемой группы данный

показатель увеличился на 3,9% по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ). Наиболее значимое усиление относительной площади bcl-2-позитивного материала выявлено в СА2 и СА4, увеличившись, соответственно по сравнению с контролем на 5,6% ( $p < 0,01$ ) и 5,7% ( $p < 0,01$ ), достигнув 8,9 [8,1;10,5] % и 9,7 [8,7;11,5] % (Рисунок 25). Иммуногистохимическое исследование с применением антител против bcl-2 в СА3 зоне крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией обнаружена цитоплазматическая экспрессия интенсивностью преимущественно умеренной выраженности (2 балла) в пирамидных нейронах и в отдельных глиальных клетках. Относительная площадь ИРМ в СА3 зоне увеличивалась на 4,4% по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,01$ ). Для СА3, как и для остальных зон сохранялась тенденция к обнаружению в наиболее сморщенных нейронах максимальной цитоплазматической реакции. Кроме того, ИРМ визуализировался в глиальных элементах нейропиля, достигая умеренно выраженной интенсивности в отдельных астроцитах.

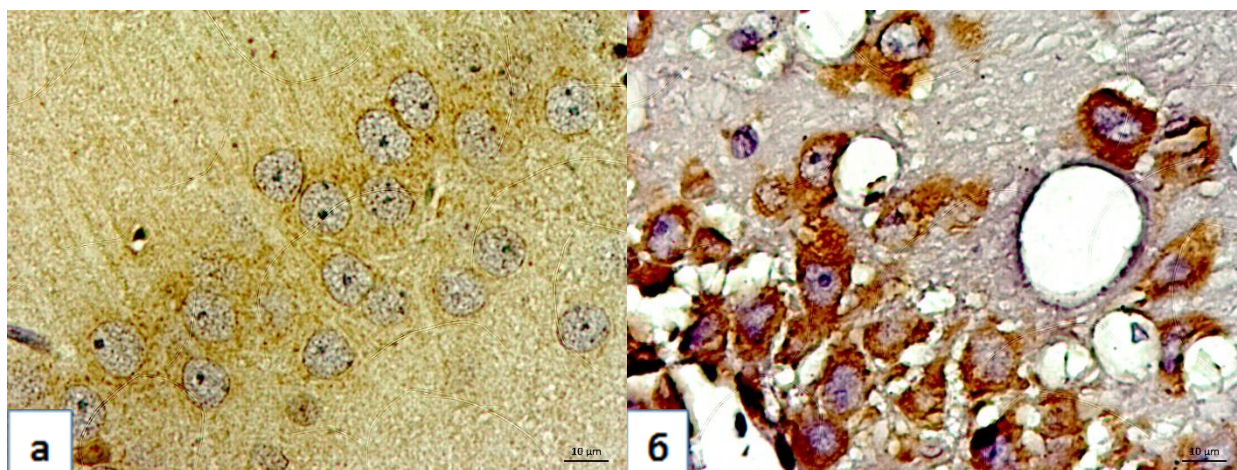


Рисунок 24. СА2 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Равномерная экспрессия в нейронах пирамидного слоя (а). Увеличение относительной площади и интенсивности иммунореактивного материала (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против bcl-2, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

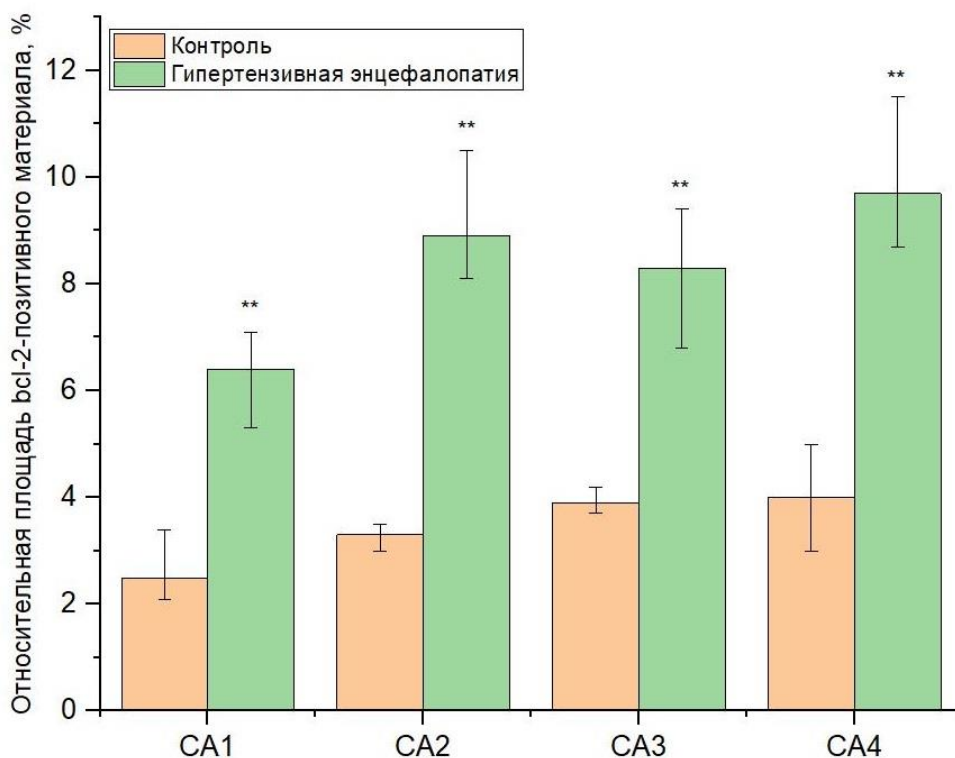


Рисунок 25. Динамика изменения vcl-2 – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* \* - ( $p < 0,01$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

### Иммуногистохимическое исследование экспрессии vax

Иммуногистохимическое исследование гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией выявило слабую (1 балл) экспрессию в отдельных пирамидных нейронах и клетках краевого и молекулярного слоев. Пылевидное цитоплазматическое накопление vax-позитивного материала не имело визуальных отличий в интенсивности от контрольной группы. В значениях относительной площади ИРМ также не было выявлено достоверных отличий от контроля ни в одной из зон.

### Иммуногистохимическое исследование экспрессии AIF

При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа крыс из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии с применением антител против AIF выявил однородную цитоплазматическую экспрессию

иммунопозитивного материала в нейронах пирамидного слоя всех зон. Экспрессия ИРМ в пирамидном слое гиппокампа крыс из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии характеризовалась преимущественно цитоплазматическим накоплением AIF-позитивного материала интенсивностью 2 балла (Рисунок 26). Кроме пирамидных нейронов, AIF-позитивный материал выявлялся в компонентах нейропиля и также носил умеренный характер (Рисунок 27). Помимо изменения интенсивности с преимущественно слабой в контроле на преимущественно умеренную (2 балла) у исследуемых животных, достоверно увеличивались значения относительной площади ИРМ в СА1, СА2 и СА4 пирамидного слоя гиппокампа (Рисунок 28). В СА1 этот показатель увеличился по сравнению с контролем на 2,7 % ( $p < 0,01$ ); в СА2 увеличение составило 2,5 % ( $p < 0,05$ ); в СА4 отмечено наиболее выраженное увеличение относительной площади ИРМ – на 2,9% ( $p < 0,05$ ) (Таблица 5).

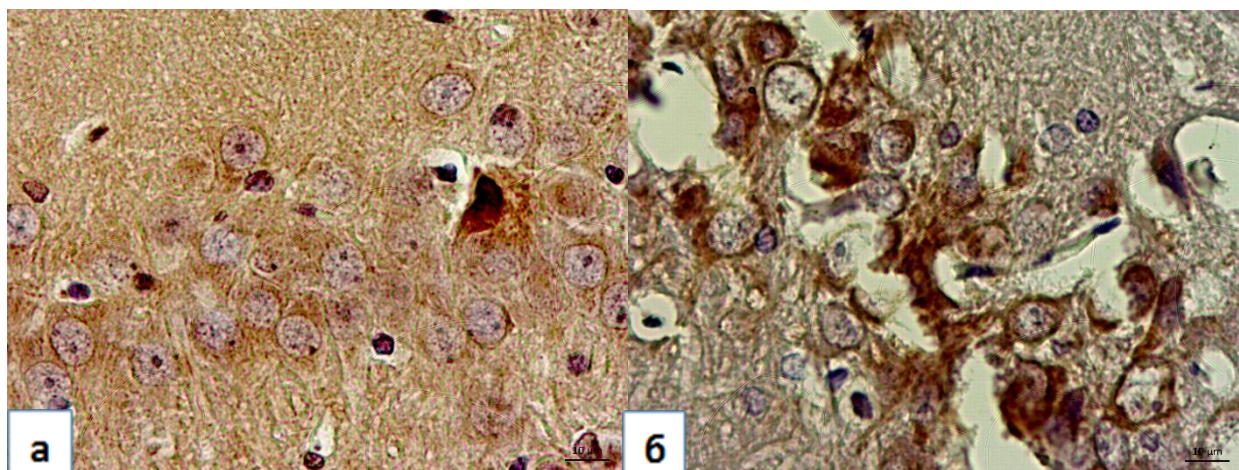


Рисунок 26. СА1 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Равномерное распределение AIF-иммунореактивного материала в нейронах пирамидного слоя преимущественно слабой интенсивности, единичные измененные нейроны с выраженной интенсивностью экспрессии ИРМ (а). Увеличение относительной площади и интенсивности иммунореактивного материала в условиях выраженного отека (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против AIF, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

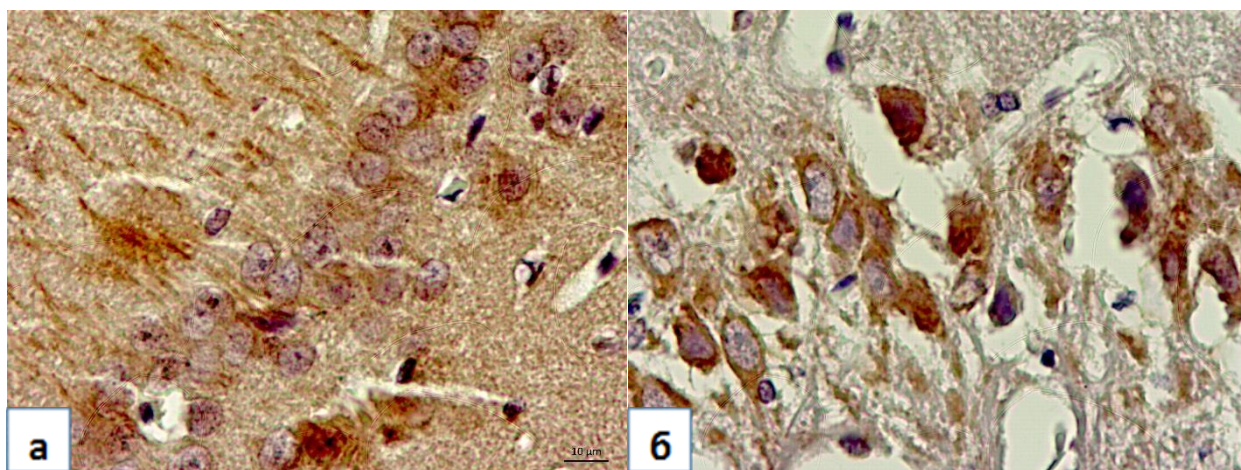


Рисунок 27. СА4 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Цитоплазматическая экспрессия АИФ-позитивного материала в пирамидных нейронах СА4 (а). Увеличение относительной площади и интенсивности иммунореактивного материала в условиях выраженного отека (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против АИФ, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

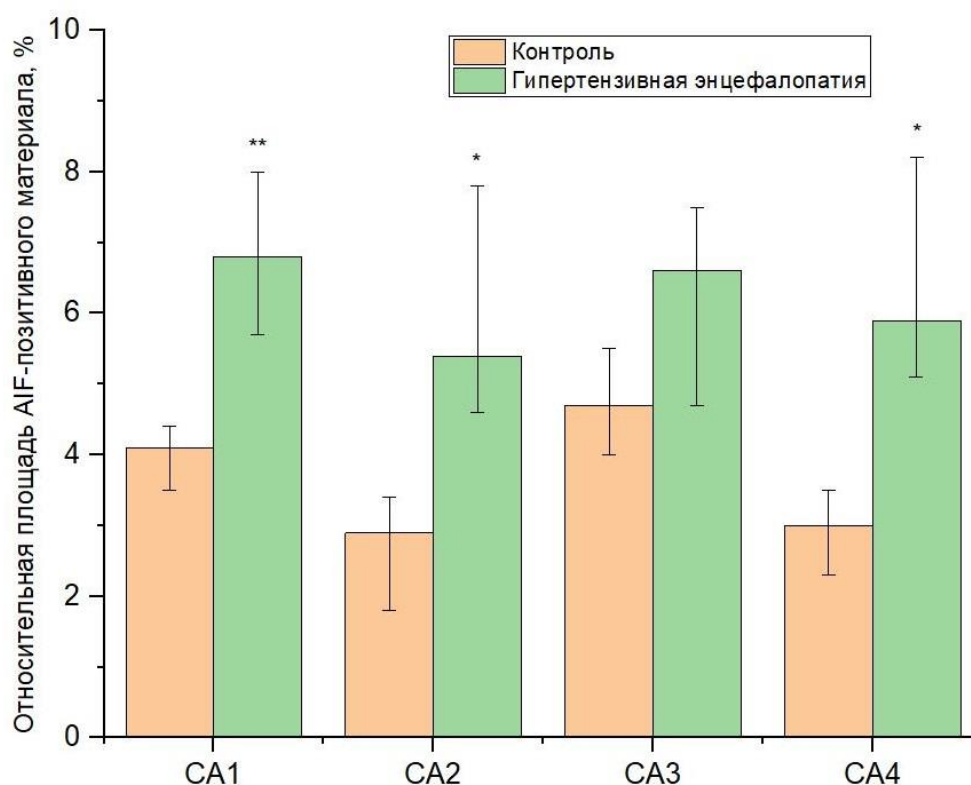


Рисунок 28. Динамика изменения АИФ – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* - ( $p < 0,05$ ), \*\* - ( $p < 0,01$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

### **Иммуногистохимическое исследование экспрессии nNOS**

Иммуногистохимическое исследование с использованием антител к nNOS не выявило различий от контроля в характере и степени экспрессии (0 – 1 балл) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя всех зон гиппокампа крыс из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии. В единичных нейронах пирамидного слоя гиппокампа контрольных крыс определялась слабая пылевидная цитоплазматическая экспрессия.

### **Иммуногистохимическое исследование экспрессии eNOS**

Иммуногистохимическое исследование с использованием антител против eNOS не выявило различий от контроля в значениях относительной площади ИРМ (Рисунок 29). Нейроны пирамидного слоя и компоненты нейропиля демонстрировали неоднородную иммунопозитивную реакцию. В цитоплазме нейронов пирамидного слоя крыс из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии экспрессия носила преимущественно слабый (1 балл) характер и оказывалась ниже, чем в группе контрольных животных, где цитоплазматическая экспрессия преимущественно носила умеренно выраженный характер (2 балла). Важная особенность распределения eNOS – визуально определяемое снижение интенсивности экспрессии до умеренно выраженной (2 балла) в стенках сосудов у крыс из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии по сравнению с группой контрольных животных, где экспрессия eNOS-позитивного материала достигала резко выраженной (3 балла).

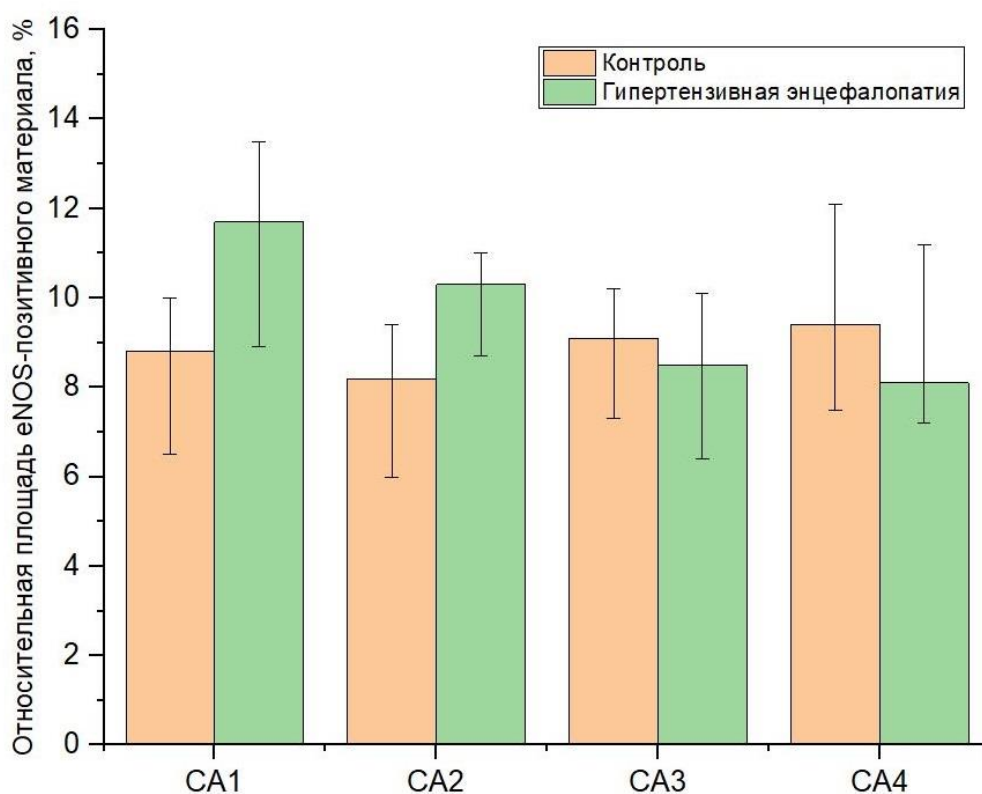


Рисунок 29. Динамика изменения eNOS – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией.

### Иммуногистохимическое исследование экспрессии iNOS

При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против iNOS в гиппокампе крыс из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатией выявлена позитивная цитоплазматическая реакция. Иммунопозитивный материал визуализировался как цитоплазматически, так и в ядрах пирамидных нейронов, а также в глиальных клетках пирамидного, полиморфного краевого и молекулярного слоев и носил преимущественно умеренно выраженный характер (2 балла). Неоднородность распределения ИРМ выражалась как в пылевидном цитоплазматическом накоплении, так и в наличии мелкоглыбчатых депозитов iNOS-позитивного материала в нейронах пирамидного слоя и в нейропиле, причем в глиальных клетках интенсивность экспрессии была более выраженной, достигая резко выраженного (3 балла) (Рисунок 30). Определяемое визуально усиление интенсивности экспрессии по сравнению с контролем, подтверждалось достоверным количественным

увеличением показателя относительной площади ИРМ во всех зонах гиппокампа исследуемых крыс (Таблица 5). Наиболее значительно увеличилась относительная площадь iNOS-позитивного материала в СА3 – на 8,3 % ( $p < 0,001$ ), составив 12,1 [9,8;14,3] %. В СА1 увеличение аналогичного показателя относительно контроля составило 3,9 % ( $p < 0,001$ ), достигнув 5,7 [4,5;6,1] %. В СА2 и СА4 соответственно, увеличение относительной площади ИРМ составило 4,5 % ( $p < 0,05$ ) и 4,8 % ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 31).

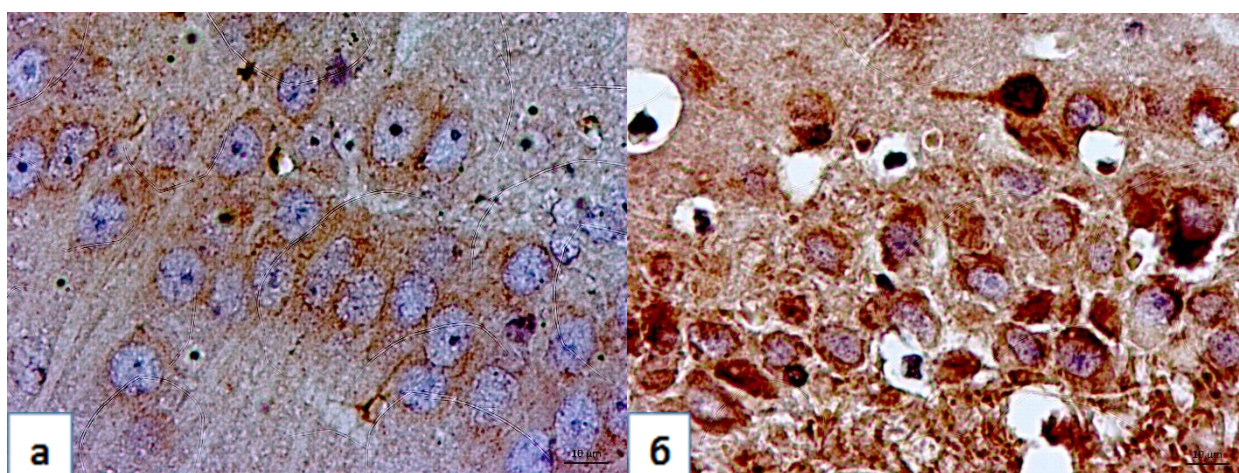


Рисунок 30. СА3 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Экспрессия iNOS-иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов нейронов и нейропиле пирамидного слоя СА3 преимущественно умеренной выраженности (а). Увеличение относительной площади и усиление интенсивности иммунореактивного материала, наиболее отчетливо отмечаемое в деформированных перикарионах нейронов пирамидного слоя СА3 на фоне спонгиоза. Усиление интенсивности ИРМ в нейропиле (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.



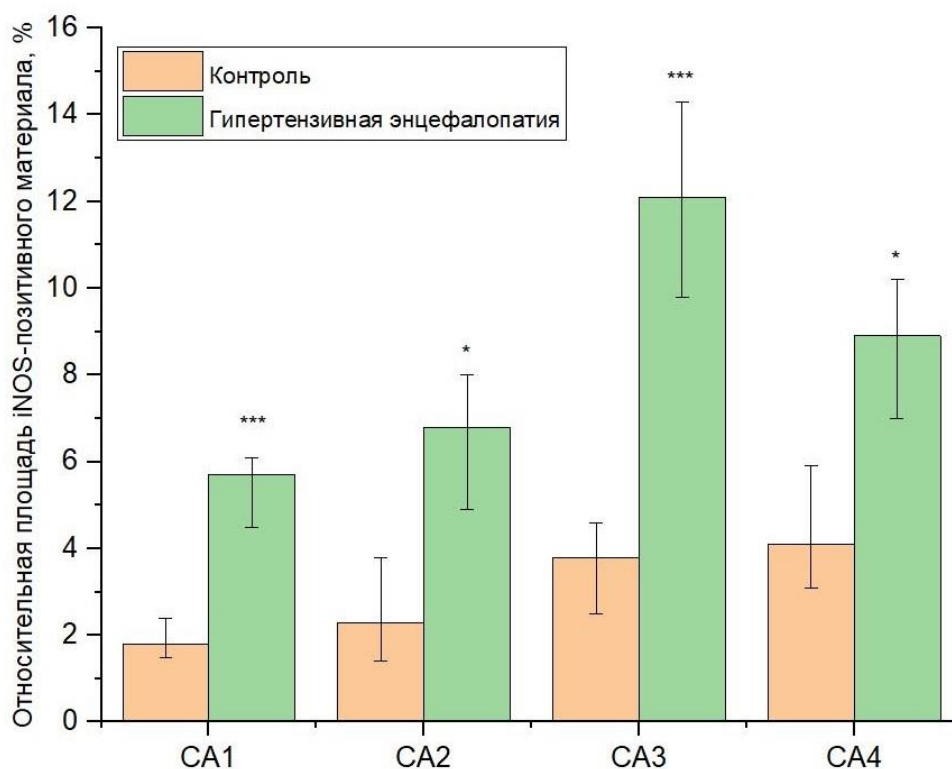


Рисунок 31. Динамика изменения iNOS – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* - ( $p < 0,05$ ), \* \* \* - ( $p < 0,001$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

### Иммуногистохимическое исследование экспрессии сериновой рацемазы

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител против сериновой рацемазы (СР) в контрольной группе преобладала цитоплазматическая экспрессия умеренно выраженной интенсивности (2 балла), в отдельных нейронах выявлялась экспрессия, достигающая 3 балла. В группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией характер экспрессии сменялся на преимущественно выраженную (3 балла). Особенностью экспрессии СР в экспериментальной группе являлась транслокация иммунореактивного (ИРМ) материала, который определялся не только в цитоплазме перикарионов, но и в отростках пирамидных нейронов (Рисунок 32). Кроме того, участки экспрессии интенсивностью преимущественно 2 балла определялись и в глиальных клетках молекулярного

и полиморфного слоев. При морфометрическом исследовании определялось увеличение относительной площади ИРМ в пирамидном слое СА1 на 5,5% по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 33).

При иммуногистохимическом исследовании СР в СА2 не обнаружено достоверных отличий в значениях относительной площади ИРМ от контрольной группы. Показатель относительной площади СР-позитивного материала составил в данной зоне 7,4 [6,5;8,9] %. При этом необходимо отметить, что ИРМ визуализировался в дендритных отростках пирамидных нейронов, что не наблюдалось в контроле. При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против СР в СА3 зоне крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией обнаружена равномерная цитоплазматическая экспрессия преимущественно умеренной интенсивности (2 балла) в пирамидных нейронах, причем, в отличие от контрольной группы, ИРМ выявлялся не только в перикарионах нейронов, но и в отростках, которые приобретали извитой вид. В СА3 зоне выявлена явная тенденция к уменьшению относительной площади ИРМ ( $p = 0,051$ ), однако, не наблюдалось изменений в интенсивности экспрессии, показатель относительной площади ИРМ составил в данной зоне 6,2 [4,7;7,1] % (Таблица 5).

При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против СР в зоне СА4 крыс из исследуемой группы также не было выявлено достоверных отличий от контроля в показателе относительной площади ИРМ. При этом, характер ИРМ сменялся на преимущественно умеренную, оценивавшуюся в 2 балла, в единичных клетках пирамидного слоя интенсивность достигала 3 балла. Следует отметить, что в контрольной группе животных уровень экспрессии СР был самым высоким в зоне СА4 как визуально по интенсивности реакции, так и подтверждался морфометрически самыми высокими значениями относительной площади ИРМ. Относительная площадь ИРМ составила в СА4 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией 8,2 [5;9,1].

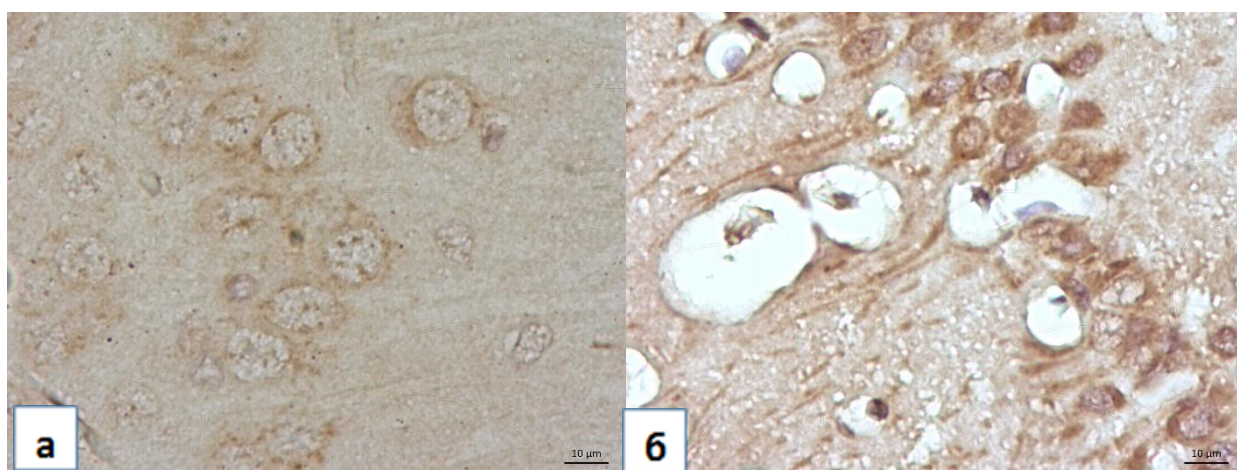


Рисунок 32. CA1 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии (б). Экспрессия СР-иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя CA1 преимущественно умеренной выраженности (а). Увеличение относительной площади и усиление интенсивности иммунореактивного материала до резко выраженной в отдельных перикарионах нейронов, транслокация ИРМ в отростки нейронов (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против СР, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

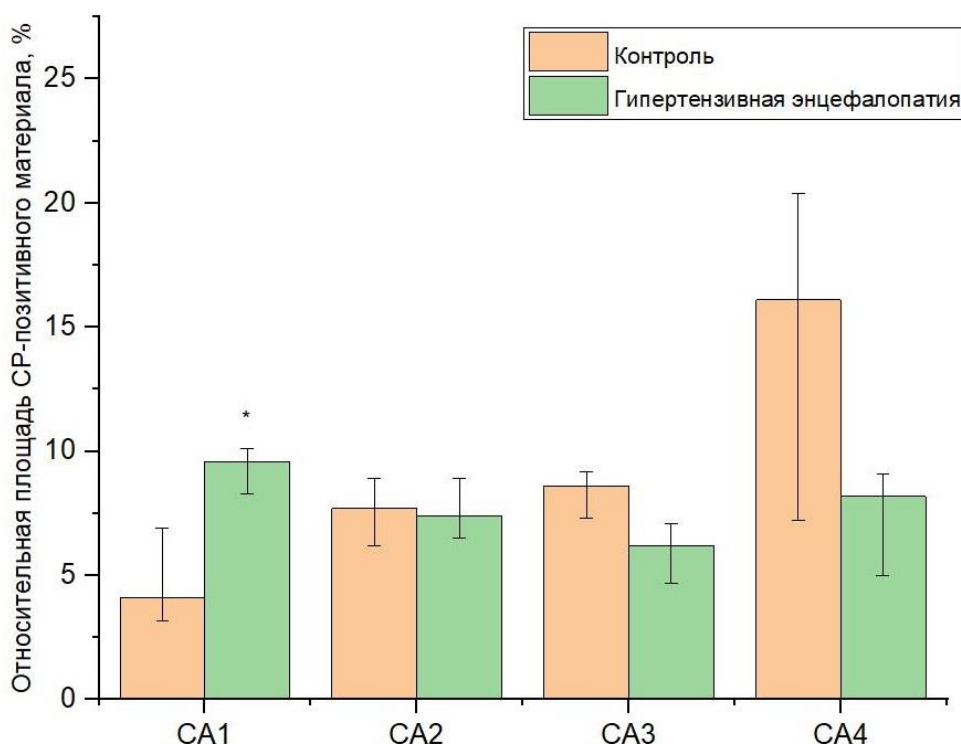


Рисунок 33. Динамика изменения СР – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. \* - ( $p < 0,05$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

Таблица 5. Иммуногистохимическая характеристика пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией

Маркер,	Контроль				Моделируемая гипертензивная энцефалопатия			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Hsp 70, ОП ИРМ, %	4,3 [3,1;4,6]	6,2 [4;8,1]	4,7 [3;6,8]	5,5 [3,2;7,1]	7,5 [4,7;10] **	9,2 [7,3;10,9] ]**	9,6 [6,4;11,1] ]**	8,1 [5,9;10,3] *
Hsp 90, ОП ИРМ, %	3,2 [1,9;4,5]	4,8 [3;6,9]	5,1 [3,3;7]	4,6 [2,9;6,1]	5,9 [4,2;8,1] *	5,7 [3,6;7,5]	4,9 [2,8;6,7]	6,2 [4,3;8,4]
GFAP, ОП ИРМ, %	5,1 [4,2;6,5]	4,0 [2,2;5,0]	1,5 [1,0;2,6]	2,3 [1,8;2,7]	4,0 [3,3;5,0]	12,9 [9,9;17,3]****	2,9[2,5;3,6]	9,2 [7,9;11,3]** *
Сериновая рацемаза, ОП ИРМ, %	4,1[3,2;6,9]	7,7[6,2;8,9]	8,6[7,3;9,2]	16,1[7,2;20,4]	9,6[8,3;10,1]*	7,4[6,5;8,9]	6,2[4,7;7,1]	8,2[5,9;11]
Veclin 1, ОП ИРМ, %	0,4 [0,1;0,7]	0,9 [0,6;0,9]	1,5 [0,9;1,8]	1,3 [1;2,2]	1,4 [1,2;2]**	1,5 [1,2;1,7]*	2,3 [1,7;2,8]	2,6 [2;2,8]
LAMP-2, ОП ИРМ, %	0,5 [0,5;0,9]	0,6 [0,5;0,8]	1,2 [1;1,4]	0,6 [0,4;0,8]	1,1 [0,9;1,4]	1,9 [1,3;1,9]*	1,5 [1,2;1,9]	2,1 [1,7;2,5] **
iNOS, ОП ИРМ, %	1,8 [1,5;2,4]	2,3 [1,4;3,8]	3,8 [2,5;4,6]	4,1 [3,1;5,9]	5,7 [4,5;6,1] ***	6,8 [4,9;8] *	12,1 [9,8;14,3] ***	8,9 [7;10,2] *
eNOS, ОП ИРМ, %	8,8 [6,5;10]	8,2 [6;9,4]	9,1 [7,3;10,2]	9,4 [7,5;12,1]	11,7 [8,9;13,5]	10,3 [8,7;11]	8,5 [6,4;10,1]	8,1 [7,2;11,2]
Vcl-2, ОП ИРМ, %	2,5 [2,1;3,4]	3,3 [3;3,5]	3,9 [3,7;4,2]	4 [3;5]	6,4 [5,3;17,1] ]**	8,9 [8,1;10,5] ]**	8,3 [6,8;9,4] **	9,7 [8,7;11,5]**
Vax, ОП ИРМ, %	0,9 [0,7;1]	1,2 [0,9;1,4]	1,4 [1,1;1,6]	1,2 [1;1,5]	0,7 [0,4;1,2]	1,1 [0,8;1,8]	0,8 [0,4;1,5]	1,4 [1;1,6]
AIF, ОП ИРМ, %	4,1 [3,5;4,4]	2,9 [1,8;3,4]	4,7 [4;5,5]	3 [2,3;3,5]	6,8 [5,7;8] **	5,4 [4,6;7,8] *	6,6 [4,7;7,5]	5,9 [5,1;8,2] *

Примечание. \*\*\* -  $p < 0,001$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой, \*\* -  $p < 0,01$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой; \* -  $p < 0,05$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (использован критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде медианы с указанием интерквартильного размаха (Me [Q1;Q3]).

## **3.2. Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс при моделировании стеноза сонных артерий**

### **3.2.1. Структурно-функциональные изменения в гиппокампе крыс при моделировании стеноза сонных артерий**

У крыс с моделируемым стенозом сонных артерий при гистологическом исследовании гиппокампа визуализируются все слои. Наиболее выраженные изменения были обнаружены в пирамидном слое СА1, где наряду с неизменными нейронами определялись нейроны с признаками повреждения. Дистрофические изменения в пирамидных клетках носили разную выраженность, определялись в значительном увеличении числа гиперхромных нейронов, причем в большинстве из них наблюдалась тотальная гиперхромия ядра и цитоплазмы, встречались клетки с частичным и еще реже – с тотальным хроматолизом, появлялись единичные двудыршковые нейроны. Отмечена значительная неоднородность в форме и размерах перикарионов пирамидных клеток. Появлялось большое количество клеток, в которых наряду с тотальной гиперхромией наблюдалось веретеновидное сморщивание с сохранением контуров перикариона, отмечалась патологическая извитость отростков нейронов (Рисунок 34). В сохранных нейронах четко определялось округлое центрально расположенное ядро и ядрышко. Удельное количество нейронов с признаками повреждения в СА1 гиппокампа левого полушария крыс с моделируемым стенозом сонных артерий увеличилось на 8,5% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем и составило 23,4% (Рисунок 37); в правом – увеличилось на 23% ( $p < 0,001$ ), составив 31,2% (Рисунок 38). Кроме того, для СА1 гиппокампа левого полушария крыс с моделируемым стенозом сонных артерий было характерно достоверное уменьшение средней площади перикарионов пирамидных нейронов. Данный показатель составил в левом гиппокампе 74,4 [59,8;93]  $\text{мкм}^2$  и снизился по сравнению с контролем на 33,2  $\text{мкм}^2$  ( $p < 0,001$ ) (Таблица 6). Морфометрическое исследование выявило снижение удельной плотности

нейронов в пирамидном слое левого гиппокампа - показатель удельной плотности снизился до 36,1 [29,4;40,4]% (Рисунок 39). Кроме того, для СА1 гиппокампа крыс исследуемой группы были характерны признаки сосудистых нарушений в виде умеренного перичеллюлярного отека и полнокровия.

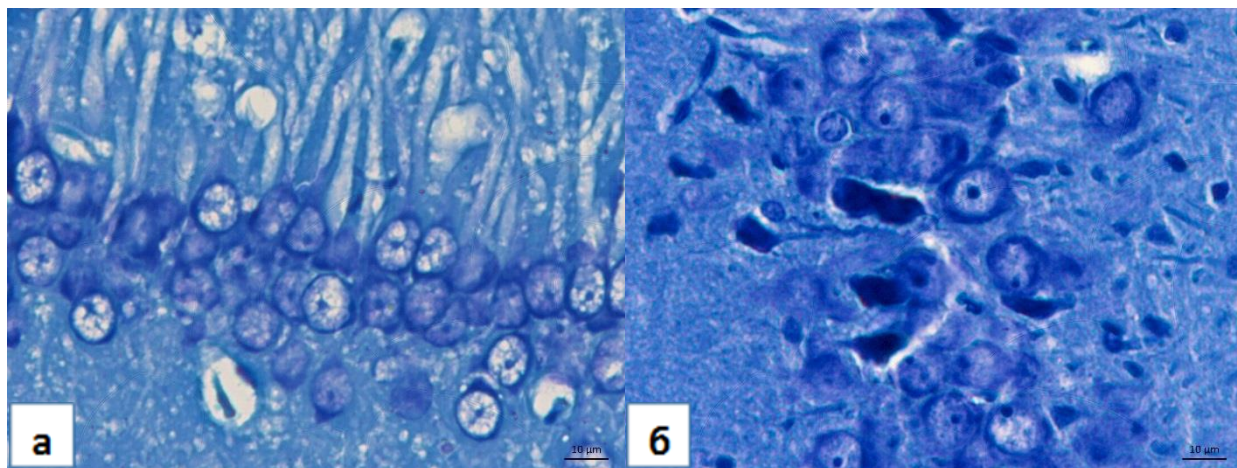


Рисунок 34. Пирамидный слой СА1 гиппокампа крысы из группы контроля (а) и крысы из группы моделируемого стеноза сонных артерий (б). Увеличение числа пирамидных нейронов с признаками повреждения (б). Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400.

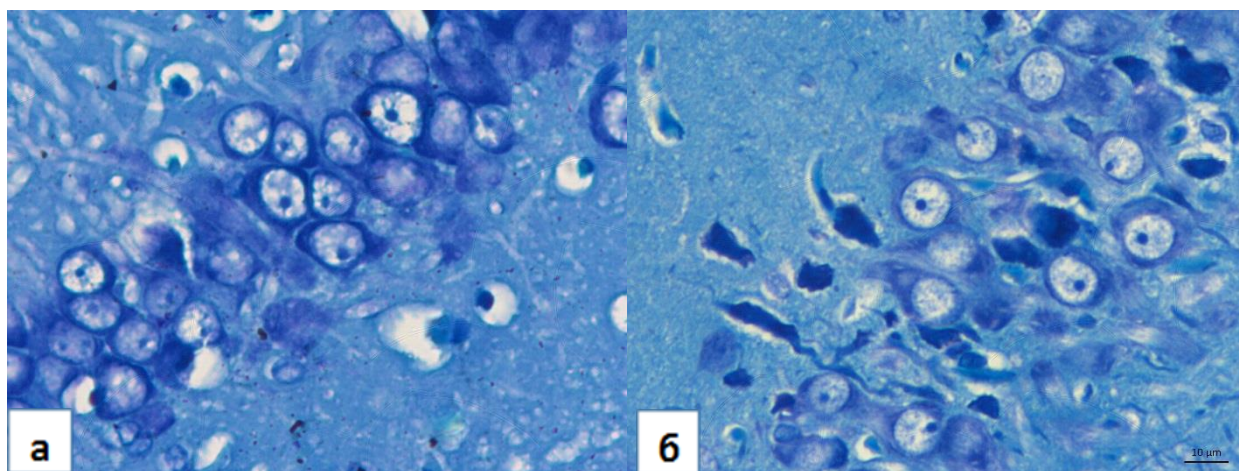


Рисунок 35. Пирамидный слой СА2 гиппокампа крысы из группы контроля (а) и крысы из группы моделируемого стеноза сонных артерий (б). Увеличение числа пирамидных нейронов с признаками повреждения (б). Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400.

При гистологическом исследовании СА2 определялись все слои гиппокампа, в пирамидном слое нейроны имели близкую к округлой форме с округлым центрально расположенным ядром и четко визуализируемым ядрышком. Встречались одиночно расположенные пирамидные нейроны с

признаками повреждения, среди которых большинство представляли клетки с измененной формой перикариона в сочетании с гиперхромией цитоплазмы (Рисунок 35). При морфометрическом исследовании значимых отличий от контроля в удельном количестве поврежденных нейронов не было выявлено. Данный показатель составил в левом гиппокампе 9,7 [6,0;15,7]%, а в правом - 10,2 [7,1;18]%. Из всех морфометрических параметров СА2 гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий достоверно изменился только показатель ядерно-цитоплазматического отношения в правом полушарии – отмечено снижение до 2,2 [2;2,3] (Таблица 6).

В СА3 гиппокампа крыс из группы с моделируемым стенозом сонных артерий схожие изменения - перицеллюлярный отек, выявляемый во всех слоях гиппокампа, сосудистые нарушения в виде полнокровия и эритроцитарных стазов. При качественном исследовании в СА3 четко визуализируются все слои. В пирамидном слое левого гиппокампа умеренные признаки повреждения в виде отдельных нейронов с признаками повреждения, среди которых преобладают нейроны с гиперхромией цитоплазмы, некоторые в сочетании с пикноморфной деформацией перикариона (Рисунок 36).

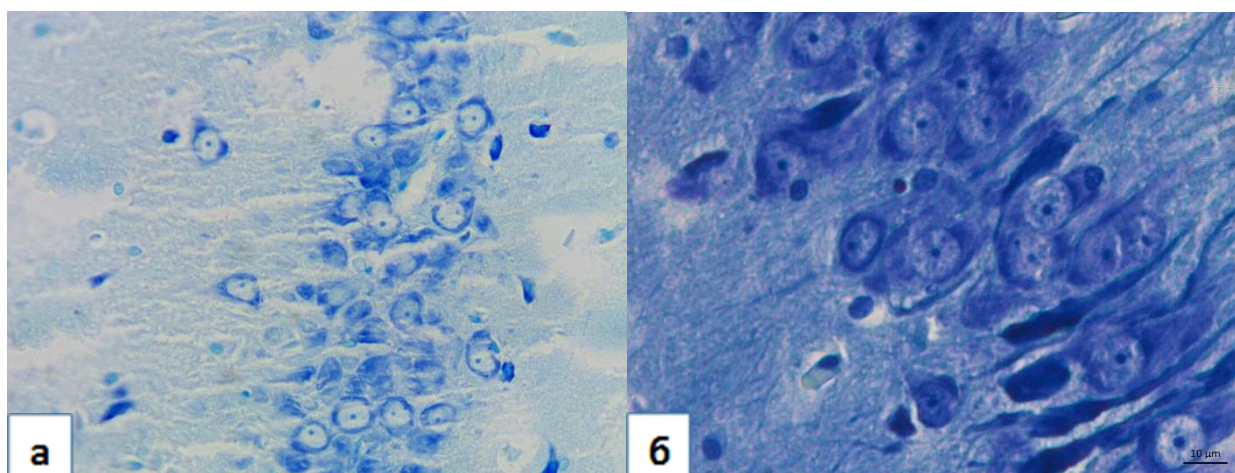


Рисунок 36. Пирамидный слой СА3 гиппокампа крысы из группы контроля (а) и крысы из группы моделируемого стеноза сонных артерий (б). Увеличение числа пирамидных нейронов с признаками повреждения (б). Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400.

Удельное количество пирамидных нейронов с признаками повреждения значимо увеличивалось в СА3 гиппокампа правого полушария на 8,7 % ( $p < 0,01$ ), составив 15 [8,2;22,1] % (Рисунок 38). Также для СА3 как левого, так и правого гиппокампа исследуемых животных было характерно снижение показателя ядерно-цитоплазматического отношения по сравнению с контролем соответственно до 2,7 [2,4;3,1] ( $p < 0,05$ ) и 2,1 [1,8;2,3] ( $p < 0,01$ ).

При гистологическом исследовании СА4 гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий наибольшие изменения выявлены в пирамидном слое, который представлен редко расположенными полиморфными нейронами, большинство из которых имели полигональную форму перикариона. Среди нейронов пирамидного слоя как в гиппокампе левого полушария, так и в гиппокампе правого полушария определялись множественные гиперхромные нейроны и нейроны с веретеновидной удлиненной формой перикариона и усиленной извитостью отростков. В гиппокампе обоих полушарий встречались единичные тотально гиперхромные нейроны с пикноморфной деформацией, а также единичные клетки-тени. В пирамидном слое СА4 гиппокампа левого полушария количество нейронов с признаками повреждения составило 8,5 [4,3;17,5] % (Рисунок 37), а в правом - 7,7 [3;10,2] % (Рисунок 38) и не имело достоверных отличий от контроля. Дистрофические изменения, выявленные визуально подтверждались морфометрически в снижении средних площадей перикариона и ядра пирамидных нейронов СА4 как в гиппокампе левого, так и в гиппокампе правого полушария крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. В левом гиппокампе средняя площадь перикариона пирамидного нейрона составила 80,3 [55,1;112,6]  $\mu\text{м}^2$ , а средняя площадь ядра нейрона 53,1 [40,9;75]  $\mu\text{м}^2$  ( $p < 0,01$ ), снизившись по сравнению с контролем соответственно на 69,2  $\mu\text{м}^2$  ( $p < 0,001$ ) и 36,2  $\mu\text{м}^2$  ( $p < 0,01$ ) (Таблица 6). В правом полушарии аналогичные показатели составили 89,3 [61,8;95]  $\mu\text{м}^2$  и 60,2 [44,7;78,8]  $\mu\text{м}^2$ , таким образом снизившись по сравнению с контролем соответственно на 22,6  $\mu\text{м}^2$  ( $p < 0,01$ ) и 28,7  $\mu\text{м}^2$  ( $p < 0,05$ ) (Таблица 6). Кроме того, в гиппокампе



обоих полушарий отмечено достоверное изменение показателя ядерно-цитоплазматического отношения, причем в левом он незначительно увеличивался ( $p < 0,05$ ), а в правом снизился вдвое ( $p < 0,001$ ). Как и в остальных зонах, в СА4 пирамидного слоя гиппокампа правого полушария головного мозга крыс с моделируемым стенозом не выявлено отличий от контроля в показателе удельной плотности перикарионов пирамидных нейронов (Рисунок 40).

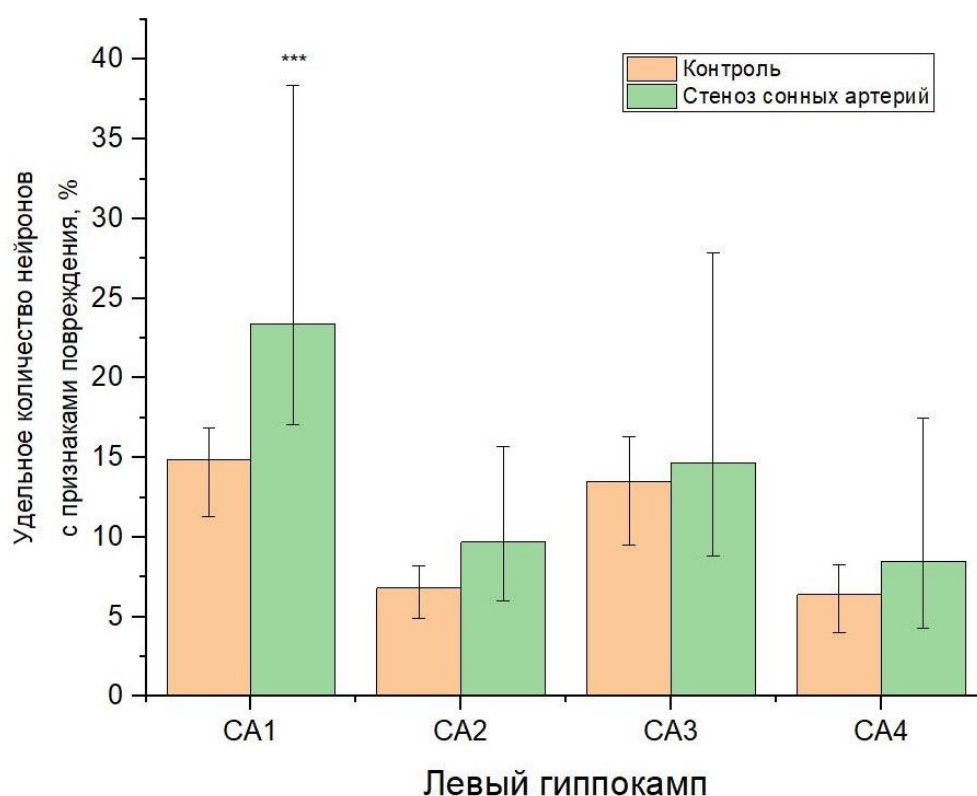


Рисунок 37. Динамика изменения удельного количества нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое гиппокампа левого полушария крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \*\*\* - ( $p < 0,001$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

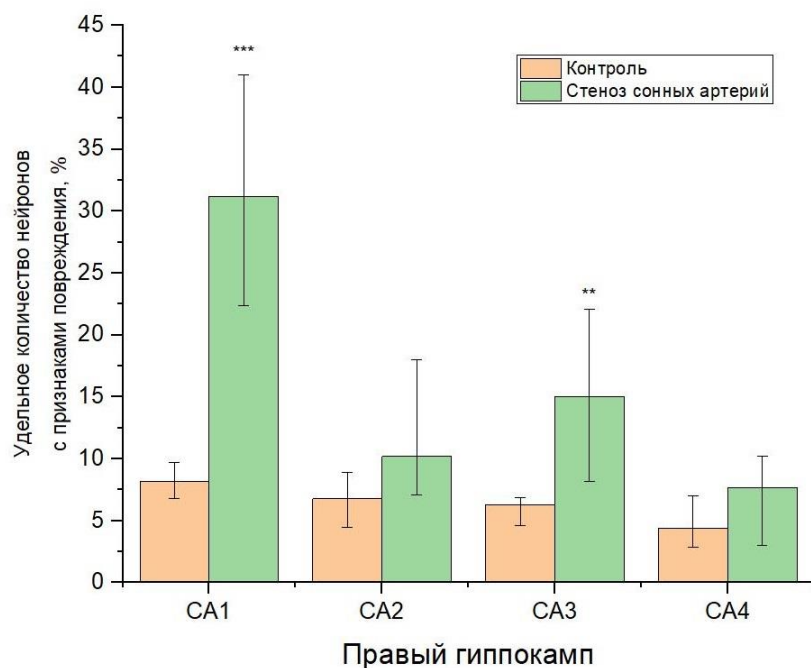


Рисунок 38. Динамика изменения удельного количества нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое гиппокампа правого полушария крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \*\* - ( $p < 0,01$ ), \*\*\* - ( $p < 0,001$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

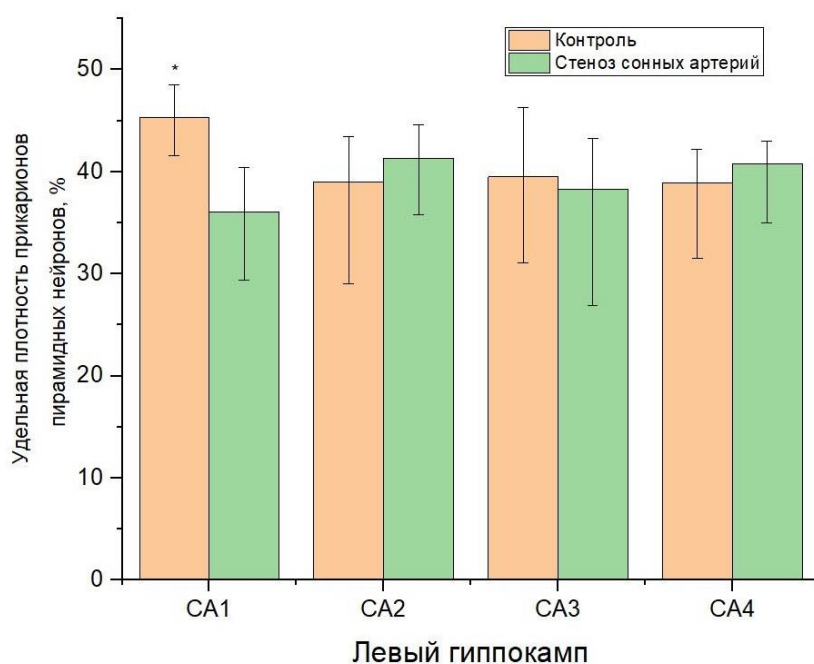


Рисунок 39. Динамика изменения удельной плотности перикарионов пирамидных нейронов в пирамидном слое гиппокампа левого полушария крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \* - ( $p < 0,05$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

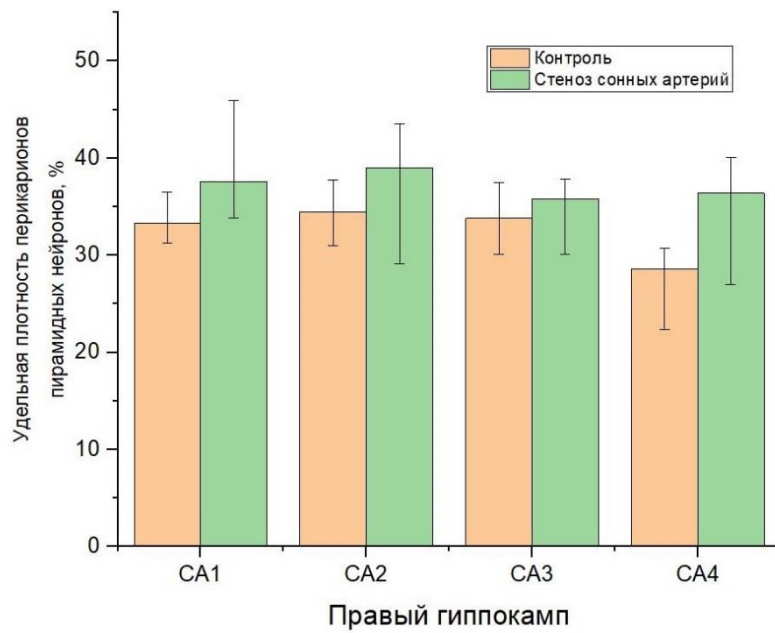


Рисунок 40. Динамика изменения удельной плотности перикарионов пирамидных нейронов в пирамидном слое гиппокампа правого полушария крыс с моделируемым стенозом сонных артерий.

Таблица 6. Морфометрические показатели пирамидного слоя гиппокамп крЫс с моделируемым стенозом сонных артерий

Параметр	Левый гиппокамп				Правый гиппокамп			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Удельное количество нейронов с признаками повреждения, %	23,4 [17,1;38,4]***	9,7 [6,0;15,7]	14,7 [8,8;27,9]	8,5 [4,3;17,5]	31,2 [22,4;41]***	10,2 [7,1;18]	15 [8,2;22,1]**	7,7 [3;10,2]
Средняя площадь перикариона нейрона, мкм <sup>2</sup>	74,4 [59,8;93]**	89,6 [61;106,2]	104,1 [79,7;135,9]	80,3 [55,1;112,6]***	86,5 [69,9;104]	81,2 [71,6;98,3]	108,2 [89;132,4]	89,3 [61,8;95]**
Средняя площадь ядра нейрона, мкм <sup>2</sup>	56,9 [39,8;68,4]	58,1 [43,7;70,5]	76,8 [51,6;90,2]	53,1 [40,9;75]**	54,5 [37,1;77,6]	56,5 [41,2;70,8]	72,9 [58,4;90,6]	60,2 [44,7;78,8]*
Средняя площадь цитоплазмы, мкм <sup>2</sup>	18,1 [13,7;25,8]**	30,4 [22,2;40]	28,9 [19,3;36,7]	28,4 [19,5;38,6]***	31,1 [20,5;38,2]**	25,2 [17,7;31]	34,4 [23,8;41,1]	30 [19,4;39,6]
Удельная плотность перикарионов, %	36,1 [29,4;40,4]*	41,3 [35,8;44,6]	38,3 [26,9;43,3]	40,8 [35,5;43]	37,6 [33,8;45,9]	39 [29,1;43,5]	35,8 [30,1;37,8]	36,4 [27;40,1]

Окончание таблицы 6

Параметр	Левый гиппокамп				Правый гиппокамп			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Удельная плотность нейропиля, %	63,9 [55,3;70,6]	58,7 [52,9;63]	61,7 [54,1;68,4]	59,2 [52,8;69,3]	62,4 [57,2;69]	61 [56,9;64,2]	64,2 [56,3;67,1]	63,6 [55,5;71,6]
Отношение относительно площади перикарионов нейронов к нейропилю, число	0,6 [0,5;0,6]*	0,7 [0,7;0,8]	0,6 [0,6;0,7]	0,7 [0,7;0,7]	0,6 [0,5;0,7]	0,6 [0,6;0,7]	0,6 [0,5;0,6]	0,6 [0,5;0,6]
Ширина пирамидного слоя, мкм	39,8 [35,1;43,7]	42,6 [37,9;47]	59,7 [53,2;68,1]	48,3 [43,1;55,7]	40,2 [35,8;43,6]	41 [34,8;45,7]	55,8 [50,4;59]	43,5 [40,9;49,8]
Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	3,1 [2,8;3,6]**	1,9 [1,6;2,1]	2,7 [2,4;3,1]*	1,9 [1,7;2]*	1,8 [1,6;2,1]**	2,2 [2;2,3]**	2,1 [1,8;2,3]**	2 [1,8;2,1]**

Примечание. \*\*\* –  $p < 0,001$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой, \*\* –  $p < 0,01$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой; \* –  $p < 0,05$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (использован критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде медианы с указанием интерквартильного размаха (Me [Q1; Q3]).

### **3.2.2. Иммунофенотипическая характеристика гиппокампа крыс при моделировании стеноза сонных артерий**

#### **Иммуногистохимическое исследование Hsp70 и Hsp90**

При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против белков теплового шока Hsp70 достоверных отличий в показателе относительной площади ИРМ от контрольной группы не было выявлено. В нейронах пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий обнаружена слабая (1 балл) пылевидная экспрессия Hsp70-позитивного материала, в единичных нейронах интенсивность достигала умеренно выраженной (2 балла). В СА3 отмечена наибольшая выраженность экспрессии Hsp70 как в показателе относительной площади ИРМ, так и в интенсивности окрашивания.

Иммуногистохимическое исследование с применением антител к белкам теплового шока Hsp90 также не выявило достоверных отличий от контроля в относительной площади ИРМ. В пирамидных нейронах доминировала слабая экспрессия (1 балл), при этом в краевом полиморфном и молекулярном слоях интенсивность была выше и в отдельных клетках встречалась мелкоглыбчатая умеренная экспрессия до 2 баллов.

#### **Иммуногистохимическое исследование экспрессии GFAP**

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к GFAP в пирамидном слое СА1 гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий относительная площадь ИРМ составила 9,8 [6,1;11,3] % и достоверно не отличалась от контрольной группы, при этом отмечена явная тенденция к увеличению ( $p=0,058$ ) (Рисунок 42). В большинстве астроцитов выявлялась выраженная экспрессия на уровне 2-3 баллов и в характере также не отличалась от контроля. Для пирамидного слоя СА2 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатии выявлено усиление экспрессии, увеличение относительной площади ИРМ составило здесь по

сравнению с контролем 6,3 % ( $p < 0,01$ ) и достигло 10,3 [7,8;12,6] % (Таблица 7). В большинстве клеток глии СА2 определялась выраженная экспрессия на уровне 3 баллов. При исследовании СА3 пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий выявлено максимальное среди всех зон увеличение относительной площади GFAP-позитивного материала – на 6,6 % по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ). В СА3 сохранялась характерная для СА1 и СА2 картина расположения астроцитов – преимущественно за пределами пирамидного слоя, в пирамидном слое присутствуют активно ветвящиеся астроцитарные отростки, выраженность экспрессии ИРМ на уровне 3 баллов (Рисунок 41). В пирамидном слое СА4 крыс исследуемой группы также выявлено достоверное увеличение относительной площади ИРМ – на 4,1 % по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ), таким образом данный показатель составил 5,6 [5,1;7] % (Таблица 7). Как и в остальных зонах, в СА4 характер экспрессии был преимущественно выраженным (3 балла).

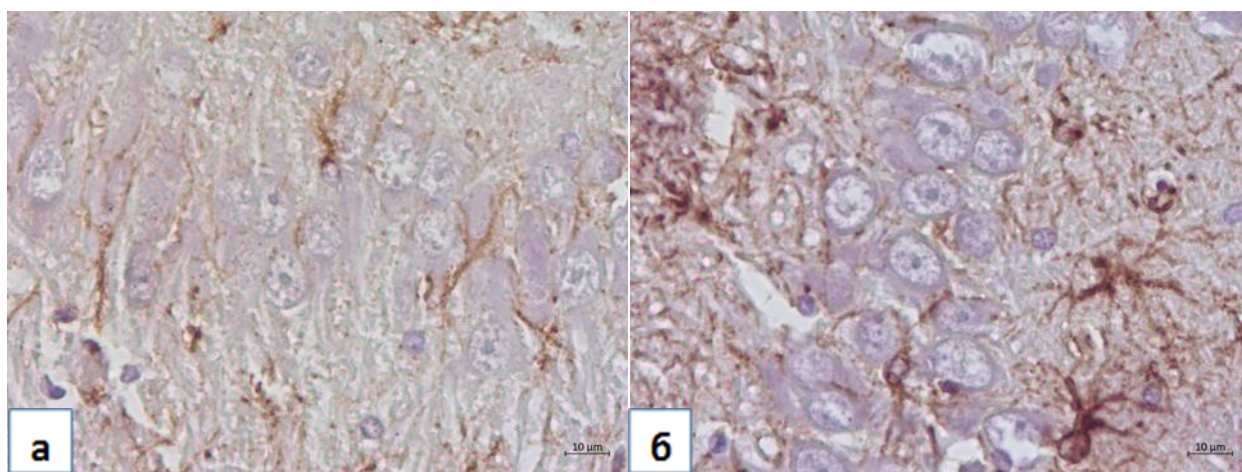


Рисунок 41. СА3 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемого стеноза сонных артерий (б). Увеличение относительной площади GFAP-иммунореактивного материала, активно ветвящиеся отростки астроцитов между перикарионами нейронов пирамидного слоя СА3 (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400

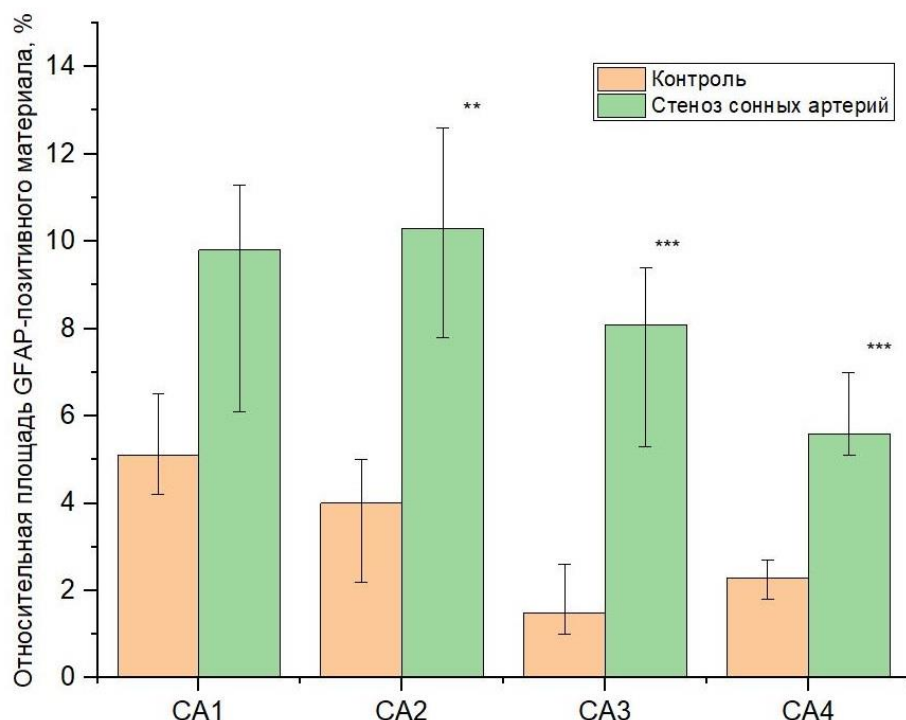


Рисунок 42. Динамика изменения GFAP – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \*\*\* - ( $p < 0,001$ ), \*\* - ( $p < 0,01$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

### Иммуногистохимическое исследование *beclin1*

При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против белка *beclin 1* в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий обнаружена слабая (1 балл) равномерная цитоплазматическая экспрессия, максимально выраженная в зоне CA3, где встречались единичные пирамидные нейроны с интенсивность *beclin 1*-положительного материала до 2 баллов. Достоверное усиление экспрессии обнаружено в зоне CA1, где относительная площадь ИРМ увеличивалась на 1,1% по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 44). При этом интенсивность и характер экспрессии не менялись, оставаясь слабоинтенсивной (Рисунок 43). Однако, в единичных нейронах с деформированными перикарионами определялись депозиты умеренно



выраженной интенсивности ИРМ. В зонах CA2, CA3 и CA4 достоверных отличий не выявлено.

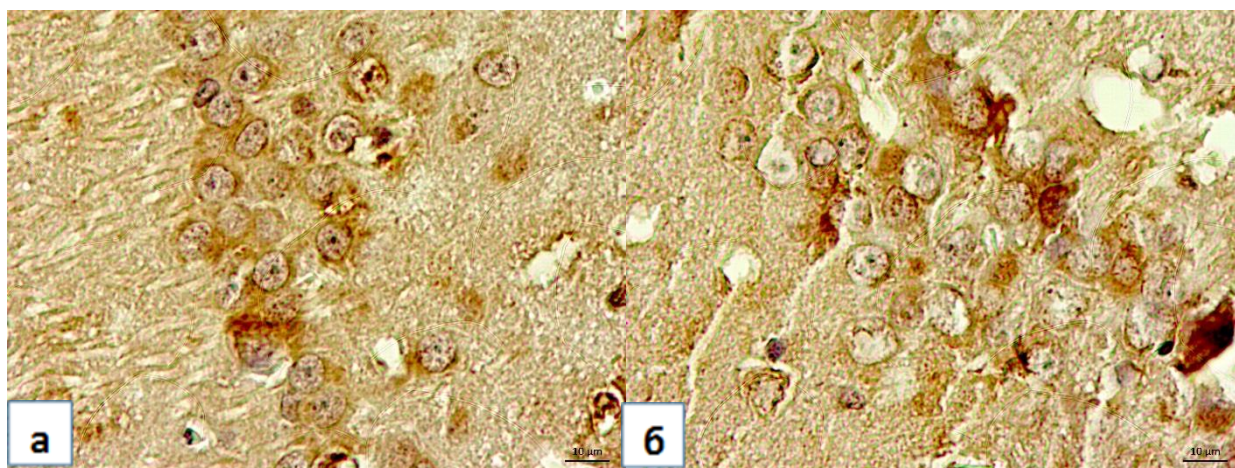


Рисунок 43. CA1 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемого стеноза сонных артерий (б). Увеличение относительной площади beclin-1-иммунореактивного материала, наиболее ярко выраженное в нейронах с признаками повреждения (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против beclin-1, докраска гематоксилином. Ув. X 400

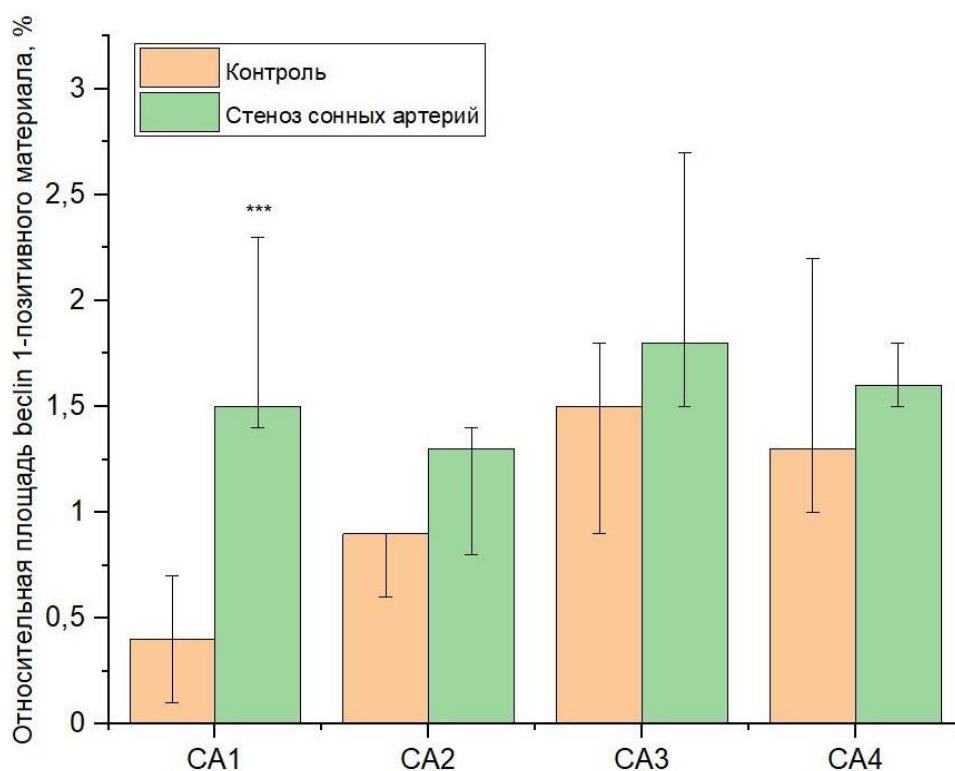


Рисунок 44. Динамика изменения beclin-1 – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \* \* \* - ( $p < 0,001$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

## Иммуногистохимическое исследование. LAMP2

При иммуногистохимическом исследовании с применением антител к LAMP-2 гиппокампа крыс из группы моделируемого стеноза общих сонных артерий выявлена неоднородность в распределении цитоплазматического иммунопозитивного материала. Мелкоглыбчатое накопление ИРМ обнаруживалось как в цитоплазме пирамидных нейронов, так и в микроглиальных элементах, причем в глии краевого полиморфного слоя экспрессия носила более выраженный характер. Достоверное усиление экспрессии ИМ по сравнению с контролем как в относительной площади на 0,8% ( $p < 0,05$ ), так и в интенсивности реакции выявлено в зоне CA1 (Рисунок 45). Преимущественно слабая экспрессия в CA1 гиппокампа контрольных крыс сменялась на умеренную в группе исследуемых животных. В CA2, CA3 и CA4 не выявлено достоверных отличий от контроля в уровне экспрессии.

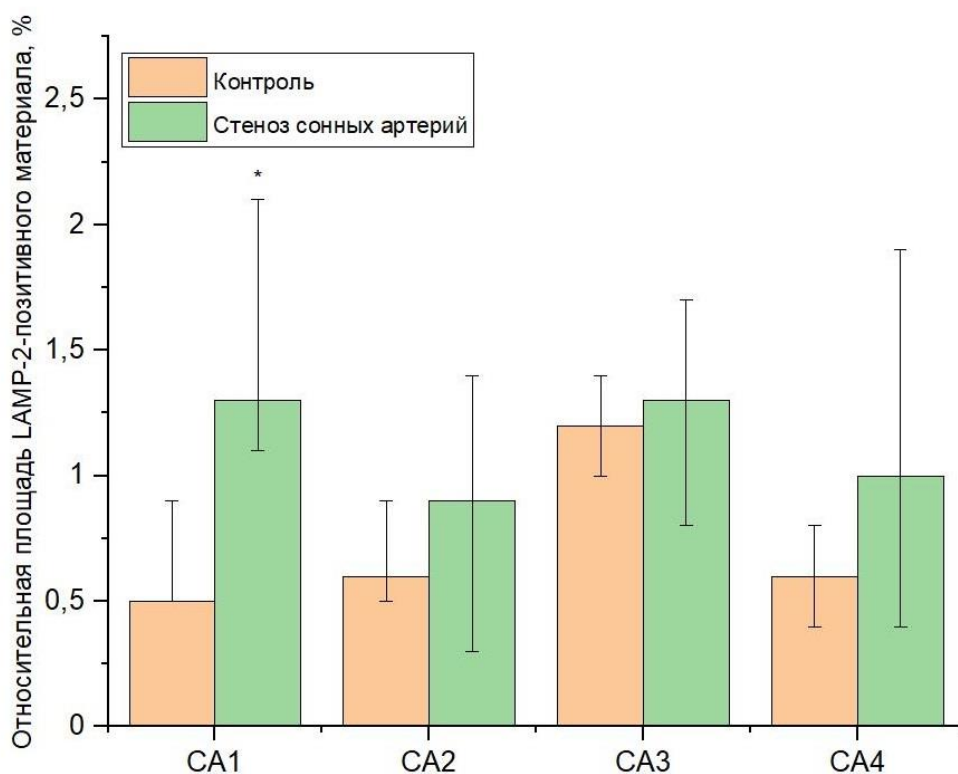


Рисунок 45. Динамика изменения LAMP-2 – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \* - ( $p < 0,05$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

## Иммуногистохимическое исследование bcl-2

При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий с применением антител против bcl-2 иммунопозитивный материал выявлен во всех зонах, в пирамидном слое обнаруживался в цитоплазме пирамидных нейронов, причем более интенсивно в пикноморфных перикарионах. В пирамидном слое зоны СА1 уровень интенсивности экспрессии составлял 1 балла, в отдельных клетках до 2 баллов. Также были выявлены клетки полиморфного слоя с экспрессией ИРМ на уровне 1-2 балла. В зоне СА2 преимущественный характер экспрессии 1 балл с тенденцией к усиленной экспрессии ИРМ в поврежденных пирамидных нейронах до 2 баллов.

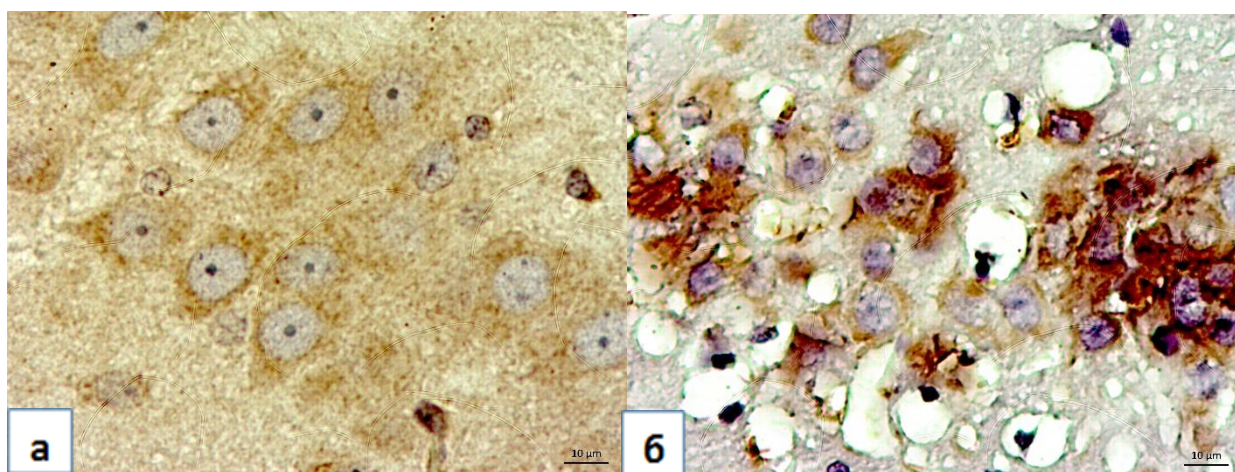


Рисунок 46. СА3 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемого стеноза сонных артерий (б). Увеличение относительной площади bcl-2-иммунореактивного материала, пирамидные нейроны с резко выраженной экспрессией ИРМ на фоне отека (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против bcl-2, докраска гематоксилином. Ув. X 400

В прилегающей к гиппокампаму зубчатой извилине также выявлена экспрессия bcl-2-позитивного материала интенсивностью 1-2 балла. Визуально наиболее интенсивная экспрессия ИРМ выявлялась в зонах СА3 и СА4 пирамидного слоя, где в большинстве клеток носила умеренно выраженный характер (2 балла) (Рисунок 46). Подобная структура

распределения ИМ характерна как для левого полушария, так и для правого. Достоверное усиление экспрессии ИМ выявлено в зонах СА3 и СА4, где показатель относительной площади ИМ увеличивался на 3,4% ( $p < 0,01$ ) и 3,1% ( $p < 0,01$ ) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 47).

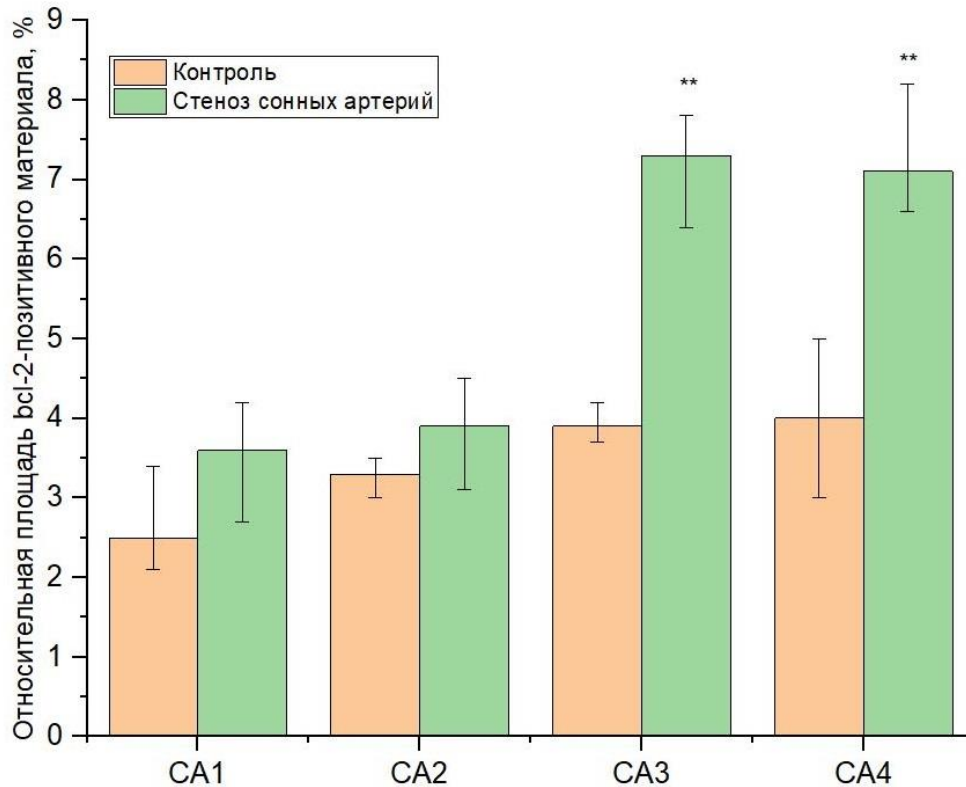


Рисунок 47. Динамика изменения bcl-2 – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \* \* - ( $p < 0,01$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

### Иммуногистохимическое исследование бах

При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против бах выявлена однородная, преимущественно слабая цитоплазматическая экспрессия бах-позитивного материала во всех зонах гиппокампа. Достоверное увеличение относительной площади ИМ на 0,7 % по сравнению с контролем обнаружено в зоне СА1 ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 49). При этом, интенсивность экспрессии визуально сменялась на умеренно выраженную, в отдельных нейронах с признаками повреждения определялась экспрессия до 3 баллов (Рисунок 48).

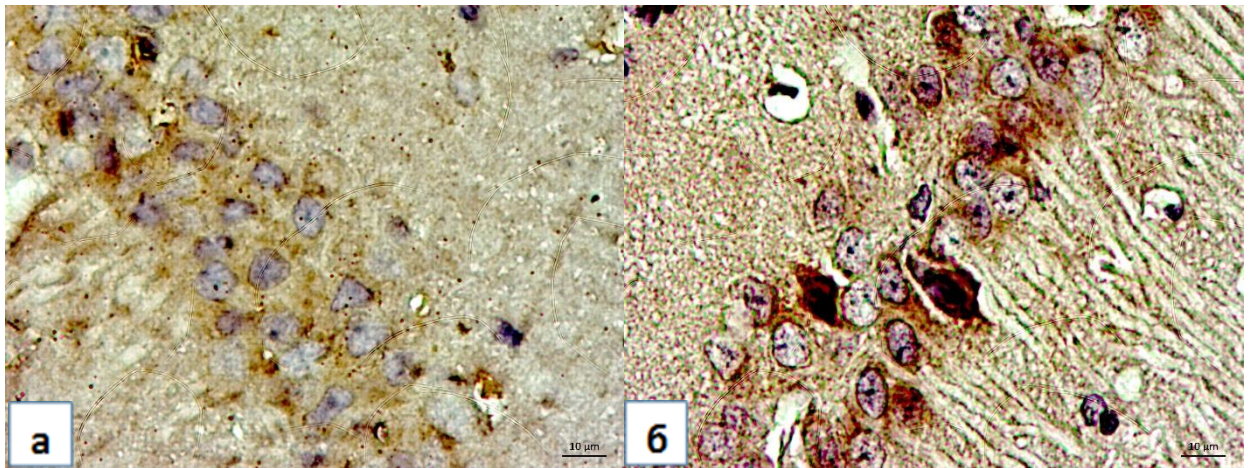


Рисунок 48. CA1 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемого стеноза сонных артерий (б). Усиление интенсивности экспрессии, отдельные веретеновидно сморщенные нейроны с экспрессией ИРМ до 3 баллов (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против vax, докраска гематоксилином. Ув. X 400

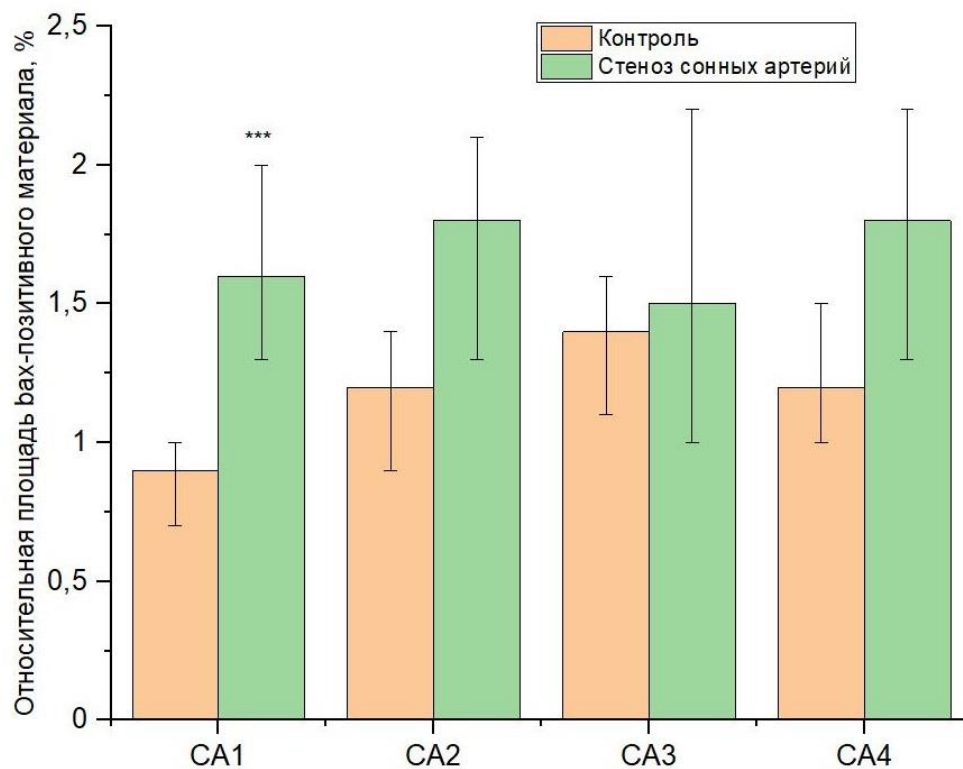


Рисунок 49. Динамика изменения vax – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \* \* \* - ( $p < 0,001$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

## Иммуногистохимическое исследование AIF

При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий с применением антител против AIF выявлена неоднородная цитоплазматическая экспрессия иммунопозитивного материала в нейронах пирамидного слоя всех зон. Нейроны пирамидного слоя CA1 и CA3 характеризовались пылевидным накоплением ИРМ преимущественно умеренной интенсивности в виде ободка вокруг ядра. Встречались отдельные пирамидные нейроны как с цитоплазматической, так и с ядерной экспрессией AIF-позитивного материала (Рисунок 50). CA1 и CA3 гиппокампа крыс с моделируемым стенозом характеризовались достоверным усилением экспрессии, выявляемым как визуально в изменении интенсивности окрашивания до резко выраженной в единичных перикарионах пирамидных нейронов, так и в относительной площади иммунопозитивного материала на 3,1% ( $p < 0,001$ ) и 2,8% ( $p < 0,001$ ) соответственно по сравнению с контрольной группой (Рисунок 51). Неоднородность экспрессии AIF-позитивного материала заключалась в явной визуальной разнице выраженности для различных зон. Так, в CA1 и CA3 пирамидного слоя визуализировалась преимущественно умеренная интенсивность реакции (2 балла), а в отдельных пирамидных нейронах до резко выраженной (3 балла); в то время как нейроны CA2 и CA4 проявляли слабую выраженность (1 балл). В CA2 и CA4 пирамидного слоя, помимо отсутствия отличий от контроля в выраженности экспрессии AIF-позитивного материала, не было выявлено и отличий в относительной площади ИРМ (Таблица 7).

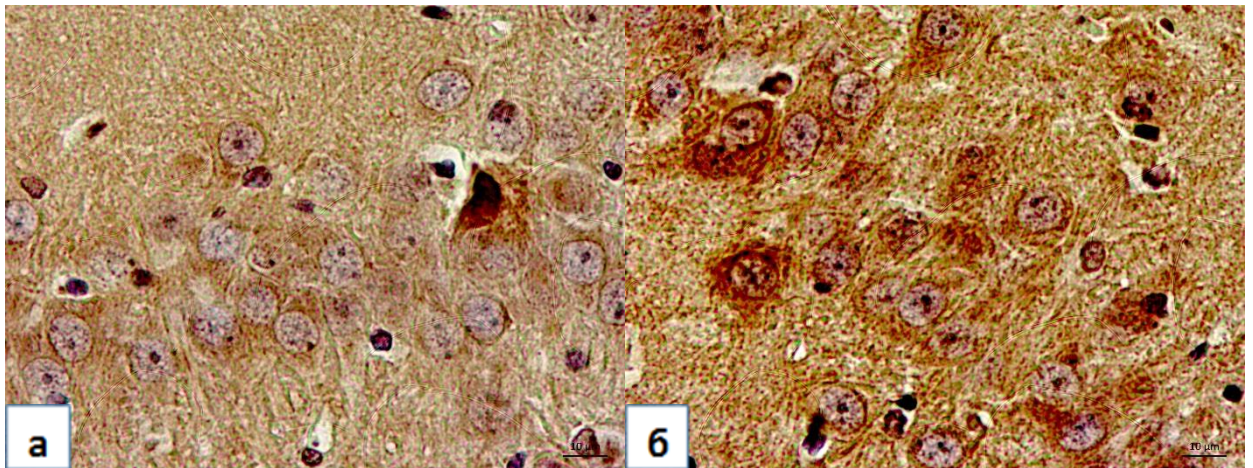


Рисунок 50. CA1 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемого стеноза сонных артерий (б). Равномерное распределение AIF-иммунореактивного материала в нейронах пирамидного слоя преимущественно слабой интенсивности, единичные измененные нейроны с выраженной интенсивностью экспрессии ИРМ (а). Увеличение относительной площади и интенсивности иммунореактивного материала (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против AIF, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

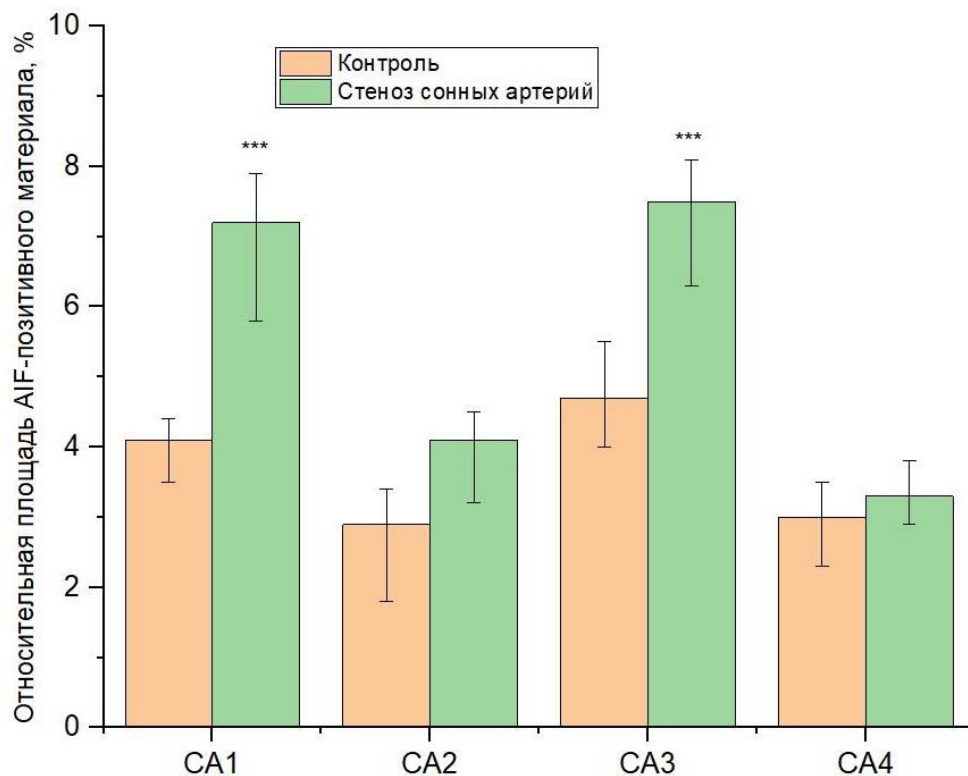


Рисунок 51. Динамика изменения AIF – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \* \* \* - ( $p < 0,001$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

## Иммуногистохимическое исследование экспрессии nNOS

При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий с использованием антител к nNOS не выявлено различий от контрольной группы в характере и степени экспрессии (1 балл) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя ни в одной из зон.

## Иммуногистохимическое исследование экспрессии сериновой рацемазы

При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий с применением антител против сериновой рацемазы выявлена равномерная цитоплазматическая экспрессия иммунопозитивного материала в нейронах и глиальных клетках пирамидного слоя всех зон. Выявлено достоверное увеличение относительной площади СР-позитивного материала в пирамидном слое СА1 на 6,4 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (Рисунок 53). Визуальных отличий в степени интенсивности реакции обнаружено не было, преобладала экспрессия умеренной интенсивности (2 балла) (Рисунок 52).

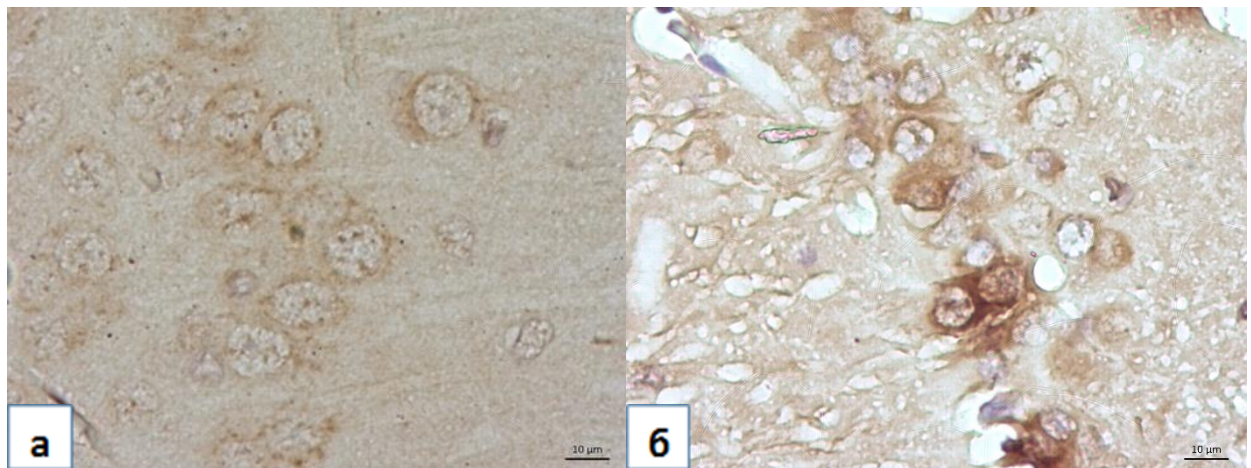


Рисунок 52. СА1 гиппокампа крысы из контрольной группы (а) и крысы из группы моделируемого стеноза сонных артерий (б). Увеличение относительной площади и усиление интенсивности СР-позитивного материала до резко выраженной в отдельных перикарионах нейронов(б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против СР, докраска гематоксилином. Ув. X 400.



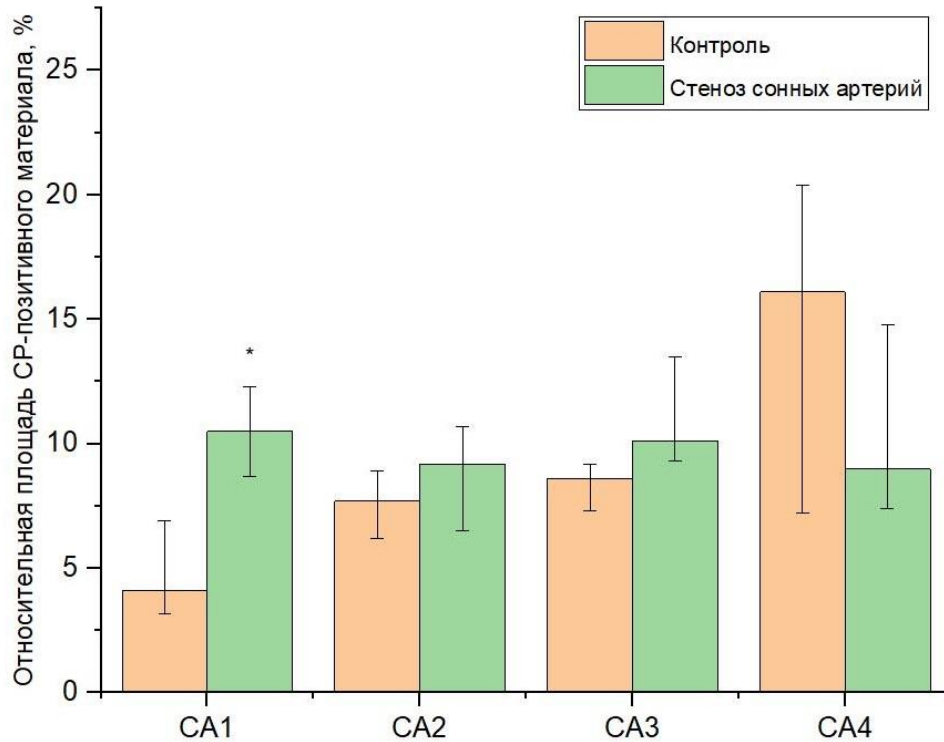


Рисунок 53. Динамика изменения СР – иммунореактивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. \* - ( $p < 0,05$ ), различия между группами достоверны (критерий Манна-Уитни).

Таблица 7. Иммуногистохимическая характеристика пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий

Маркер,	Контроль				Моделируемый стеноз сонных артерий			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Hsp 70, ОП ИРМ, %	4,3 [3,1;4,6]	6,2 [4;8,1]	4,7 [3;6,8]	5,5 [3,2;7,1 ]	2,6 [1,6;3,9 ]	7,1 [5,4;8]	3,4 [2,7;4,5 ]	2,8 [2,5;3,4]
Hsp 90, ОП ИРМ, %	3,2 [1,9;4,5]	4,8 [3;6,9]	5,1 [3,3;7]	4,6 [2,9;6,1 ]	1,4 [1;2,1]	5,2 [4,7;6,1 ]	4,0 [3,3;5,0 ]	2,8 [1,8;3,4]
GFAP, ОП ИРМ, %	5,1 [4,2; 6,5]	4,0 [2,2; 5,0]	1,5 [1,0; 2,6]	2,3 [1,8; 2,7]	9,8 [6,1;11, 3]	10,3 [7,8;12, 6]**	8,1 [5,3;9,4 ]***	5,6 [5,1;7] ***

## Окончание таблицы 7

Маркер,	Контроль				Моделируемый стеноз сонных артерий			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Сериновая рацемизация, ОП ИРМ, %	4,1[3,2;6,9]	7,7[6,2;8,9]	8,6[7,3;9,4]	16,1[7,2;20,4]	10,5 [8,7;12,3] *	9,2 [6,5;10,7]	10,1 [9,3;13,5]	9 [7,4;14,8]
Veclin 1, ОП ИРМ, %	0,4 [0,1;0,7]	0,9 [0,6;0,9]	1,5 [0,9;1,8]	1,3 [1;2,2]	1,5 [1,4;2,3] ***	1,3 [0,8;1,4]	1,8 [1,5;2,74]	1,6 [1,5;1,8]
LAMP-2, ОП ИРМ, %	0,5 [0,5;0,9]	0,6 [0,5;0,8]	1,2 [1;1,4]	0,6 [0,4;0,8]	1,3 [1,1;2,1] *	0,9 [0,3;1,4]	1,3 [0,8;1,7]	1,0 [0,4;1,9]
iNOS, ОП ИРМ, %	1,8 [1,5;2,4]	2,3 [1,4;3,8]	3,8 [2,5;4,6]	4,1 [3,1;5,9]	9,2 [6,4;13,7] ***	10,8 [6,6;13] **	6,2 [4,1;9,1]	7,4 [4,8;9,5]
eNOS, ОП ИРМ, %	8,8 [6,5;10]	8,2 [6;9,4]	9,1 [7,3;10,2]	9,4 [7,5;12,1]	5,3 [4,4;7,4]	4,7 [3,6;6,5]	5,8 [4;7,9]	5,5 [3,9;7,8]
Vcl-2, ОП ИРМ, %	2,5 [2,1;3,4]	3,3 [3;3,5]	3,9 [3,7;4,2]	4 [3;5]	3,6 [2,7;4,2]	3,9 [3,1;4,5]	7,3 [6,4;7,8] **	7,1 [6,6;8,2] *
Vax, ОП ИРМ, %	0,9 [0,7;1]	1,2 [0,9;1,4]	1,4 [1,1;1,6]	1,2 [1;1,5]	1,6 [1,3;2] **	1,8 [1,3;2,1]	1,5 [1,2;2]	1,8 [1,3;2,2]
AIF, ОП ИРМ, %	4,1 [3,5;4,4]	2,9 [1,8;3,4]	4,7 [4;5,5]	3 [2,3;3,5]	7,2 [5,8;7,9] ***	4,1 [3,2;4,5]	7,5 [6,3;8,1] ***	3,3 [2,9;3,8]

Примечание. \*\*\* -  $p < 0,001$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой, \*\* -  $p < 0,01$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой; \* -  $p < 0,05$  – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (использован критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде медианы с указанием интерквартильного размаха (Me [Q1;Q3]).

### **3.3. Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс при фармакологической коррекции**

#### **3.3.1. Фармакологическая коррекция глиатилином**

При качественном исследовании СА1 зоны гиппокампа крыс, получавших глиатилин четко определяются все слои с характерным клеточным строением. Пирамидный слой построен из перикарионов округлой или близкой к округлой формы, в большинстве клеток определяется крупное светлое ядро и ядрышко, встречаются единичные двуядрышковые клетки. Визуально количество нейронов с признаками повреждения не превышает норму, что подтверждается и морфометрически (Рисунок 54). Суммарное число клеток с гиперхромией ядра, цитоплазмы, тотально гиперхромных клеток-теней, а также клеток со сморщенными перикарионами составило в левом гиппокампе 11,6 % [8;13,3] и 11 % [7,7;12,6] в правом (Таблица 8). Однако, плотность расположения перикарионов была ниже, чем в контрольной группе. Между перикарионами обнаруживались пространства за счет умеренного перичеселлюлярного отека. Так, удельная плотность пирамидных нейронов в данной зоне составила 31 % [26,8;34,5] в гиппокампе левого полушария и 31,7 % [26;34,5] в правом. Кроме того, признаки нарушения кровообращения выявлялись и в микроциркуляторном отделе – в сосудах капиллярного типа наблюдались стазы с гемолизом эритроцитов и умеренный периваскулярный отек. При этом, наблюдаемый как в левом, так и в правом гиппокампе отек носил в левом полушарии несколько более выраженный характер. Подсчет средних размеров перикариона и ядра пирамидных нейронов зоны СА1 не выявил достоверных отличий от контрольной группы. В полиморфном краевом слое типичная цитоархитектоника с преобладанием нейроглии и редко расположенными корзинчатыми нейронами. В молекулярном слое определяется множество ветвящихся дендритов, мелкие микроглиальные клетки и астроциты. В полиморфном и молекулярном слоях, так же как и в пирамидном, выявлен

умеренный отек, формирующий картину спонгиоза. В отдельных сосудах наблюдалось утолщение и гомогенизация стенок за счет плазматического пропитывания.

В зоне СА2 гиппокампа животных данной группы наблюдались похожие изменения, прежде всего выраженные в умеренном отеке, формирующим спонгиоз во всех слоях. Обращает на себя внимание менее компактное расположение перикарионов в пирамидном слое по сравнению с контролем, при морфометрическом анализе удельная плотность перикарионов в СА2 левого гиппокампа составила 32,2 % [29,4;36,8], что достоверно выше, чем в экспериментальной группе, но ниже значений контрольной группы (Рисунок 55). В гиппокампе правого полушария показатель плотности перикарионов составил 31,7 % [26;34,5] (Таблица 8).

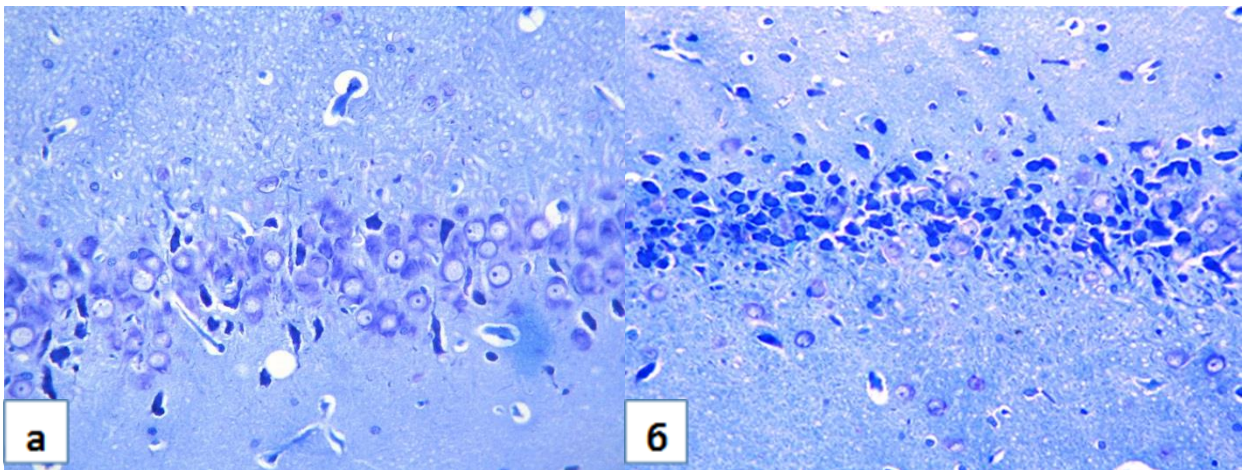
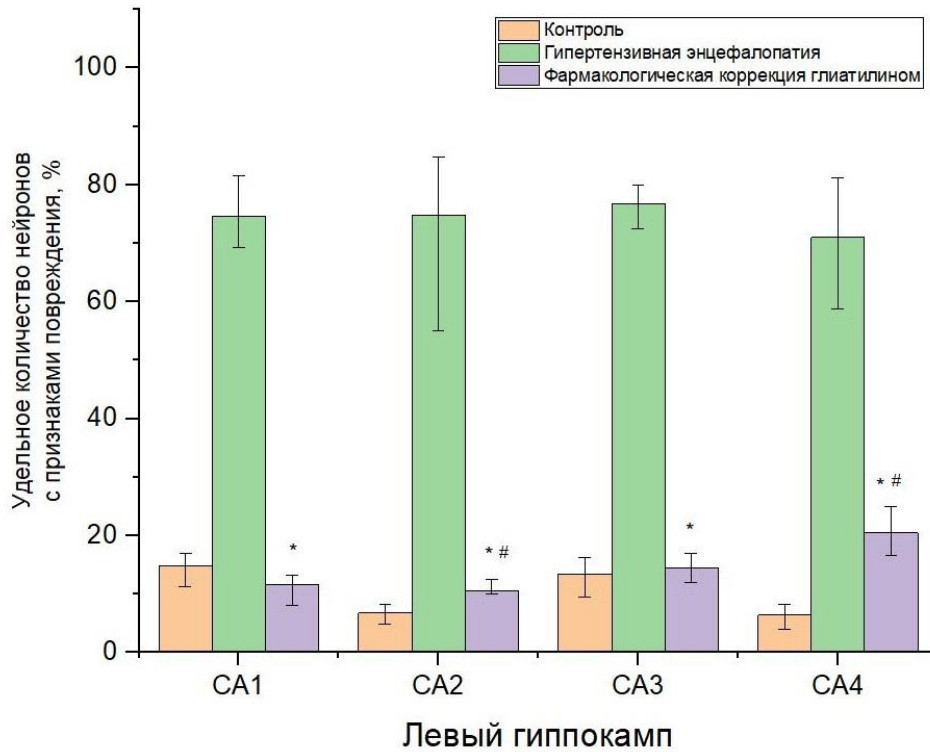
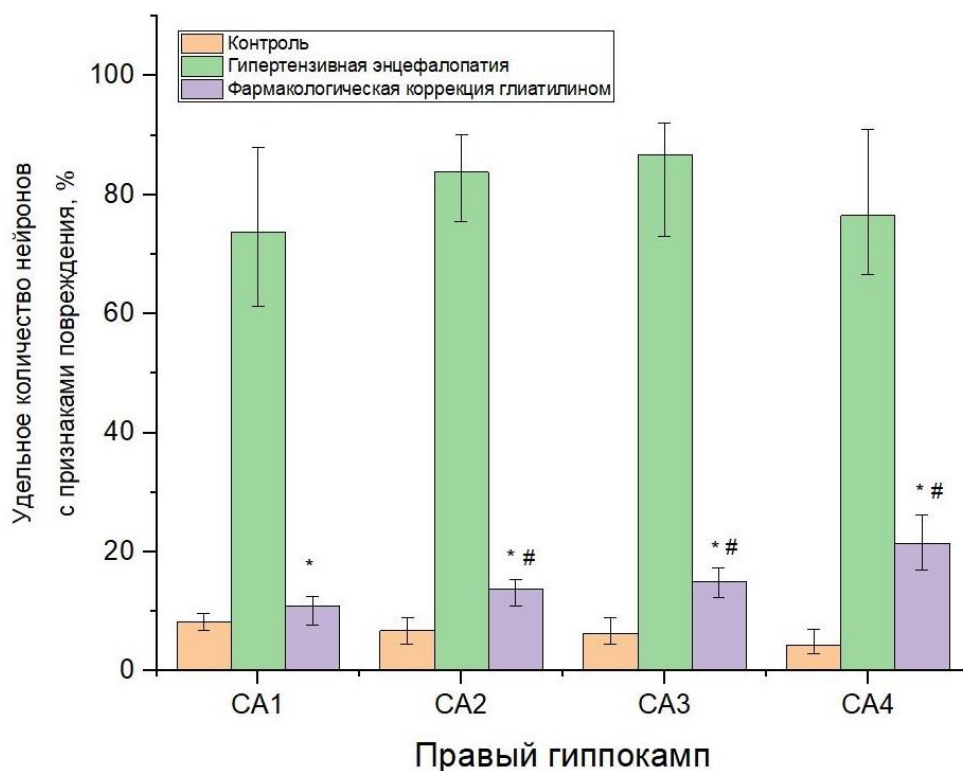


Рисунок 54. СА1 гиппокампа крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии и фармакологической коррекции глиатилином (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии без фармакологической коррекции (б).



Рисункок 55. Динамика изменения удельного количества нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое гиппокампа левого полушария крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией и фармакологической коррекцией глиатилином. \* - достоверные различия с экспериментальной группой, # - достоверные различия с контрольной группой (критерий Краскелла-Уоллиса).



Рисункок 56. Динамика изменения удельного количества нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое гиппокампа правого полушария крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией и фармакологической коррекцией глиатилином. \* - достоверные различия с экспериментальной группой, # - достоверные различия с контрольной группой (критерий Краскелла-Уоллиса).

В микроциркуляторном отделе в молекулярном слое выявлены наиболее выраженные сосудистые изменения, проявляющиеся в очаговых деструкциях стенки сосудов и диапедезе эритроцитов. В пирамидном и молекулярном слоях кровоизлияний не обнаружено, в сосудах отмечено полнокровие и стазы. В молекулярном слое кроме отека и сосудистых изменений отмечена также извитость отростков нейронов.

При качественном исследовании зоны CA3 выявлено несколько большее, чем в CA1 и CA2 зонах количество гиперхромных клеток. Для данной зоны удельное количество пирамидных нейронов с признаками повреждения составило 14,5 % [12;17] в левом гиппокампе и 15,1 % [12,4;17,3] в правом, что достоверно меньше по сравнению с экспериментальной группой (Таблица 8). В зоне CA3 сохранялись изменения, наблюдаемые в CA1 и CA2:

умеренный перицеллюлярный и периваскулярный отек, сосудистые нарушения и фокальные диапедезные кровоизлияния с деструкцией стенок сосудов микроциркуляторного русла. Средний размер перикарионов в пирамидном слое гиппокампа левого полушария составил 120,6 мкм<sup>2</sup> [109,8;134,4], средний размер ядер 95,8 мкм<sup>2</sup> [78,9;101,5], значимо не отличаясь от значений контрольной группы. Краевой полиморфный и молекулярный слои четко отграничены от пирамидного, содержат множественные ветвящиеся отростки и глиальный компонент. В полиморфном слое преобладают астроциты, наблюдаются редко расположенные корзинчатые клетки.

Из всех зон гиппокампа данной группы животных, в зоне СА4 наблюдались наиболее выраженные изменения. Это проявлялось в большем числе поврежденных пирамидных нейронов по сравнению с другими отделами гиппокампа. В пирамидном слое СА4 отмечалась неоднородность клеточного состава. Среди нейронов большинство имело четко визуализируемое ядро, ядрышко и цитоплазму, встречались нейроны с гиперхромией ядра и цитоплазмы, а также отдельные клетки веретеновидной формы и с извитыми отростками. Число нейронов с признаками повреждения составило 20,5 % [16,7;25] в гиппокампе левого полушария и 21,5 % [17;26,2] в правом (Таблица 8), что достоверно больше, чем в контрольной группе, но в то же время достоверно и значительно меньше по сравнению с экспериментальными крысами (Рисунок 56). Отек в данной зоне также был несколько более выражен, чем в остальных зонах, причем в гиппокампе левого полушария выражен более, чем в правом. Наблюдаемые в СА1, СА2 и СА3 признаки нарушенного кровообращения выявлялись и в СА4, главным образом выражались в резком полнокровии сосудов, фокальными диапедезами эритроцитов, гомогенизацией и утолщением стенок сосудов за счет плазматического пропитывания.

Таблица 8. Морфометрические показатели гиппокампа крыс, получавших глиатилин

Параметр	Левый гиппокамп				Правый гиппокамп			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Удельное количество гиперхромных нейронов, %	11,6 [8;13,3]** *	10,5 [10;12,5]* **	14,5 [12;17]* **	20,5 [16,7;25] ***	11 [7,7;12,6] ]***	13,8 [10;15,3] ***	15,1 [12,4;17,3] ***	21,5 [17;26,2] ***
Средняя площадь перикариона нейрона, мкм <sup>2</sup>	93,3 [88,9;96,1] ]*	79,3 [72,4;90,3]	120,6 [109,8;134,4]*	92,3 [80;100,7]	95,6 [87,4;100,3]*	77 [72,6;83,8]	117,5 [105,7;122,8]	84,2 [80,2;90,5]*
Средняя площадь ядра нейрона, мкм <sup>2</sup>	56,7 [51,4;64,3]	55,7 [38,6;58,6]	95,8 [78,9;101,5]**	58,4 [41,1;77,7]	61,2 [57,7;64,4]	50,9 [44;55,4] *	90,7 [81,1;98,5]	54,7 [43,9;59,2]*
Удельная плотность перикарионов, %	31 [26,8;34,5]	32,2 [29,4;36,8] *	33,4 [32,4;36] **	28,5 [27,8;30,1]	28,8 [23,9;32,4]	31,7 [26;34,5]	26,6 [23,1;34,4]	29,9 [27,2;35,3]

*Примечание.* \*\*\* -  $p < 0,001$  – различия достоверны по сравнению с экспериментальной группой, \*\* -  $p < 0,01$  – различия достоверны по сравнению с экспериментальной группой; \* -  $p < 0,05$  – различия достоверны по сравнению с экспериментальной группой (использован критерий Манна-Уитни).

### 3.3.2. Фармакологическая коррекция С-40

Качественный анализ CA1 зоны гиппокампа выявил неоднородный клеточный состав пирамидного слоя как в левом полушарии, так и в правом. Среди нейронов с четким контуром перикариона, округлым ядром и ядрышком встречались нейроны с различной степенью гиперхромии, вплоть до тотальной. Дистрофические изменения нейронов выражались также в сморщивании перикарионов (Рисунок 57). Менее компактное по сравнению с контрольной группой расположение нейронов связано с умеренным перицеллюлярным отеком. В полиморфном и молекулярном слоях, локализованный главным образом вокруг глиальных клеток, отек носил более



выраженный характер, чем в пирамидном слое. Число нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое левого гиппокампа составило 13,8 % [9,2;15,3], в правом 15,6 % [12;17,6], что достоверно меньше по сравнению с контролем (Рисунок 58). Удельная плотность перикарионов составила в пирамидном слое данной зоны для левого и правого гиппокампа соответственно 30,8 % [27,5;32,3] и 29,6 % [25;31,7] (Таблица 9).

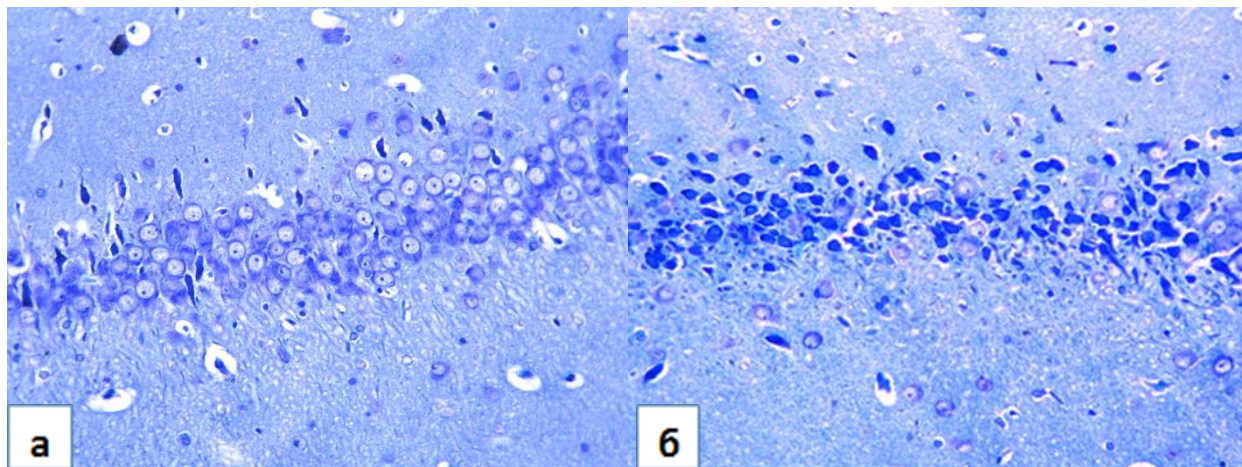


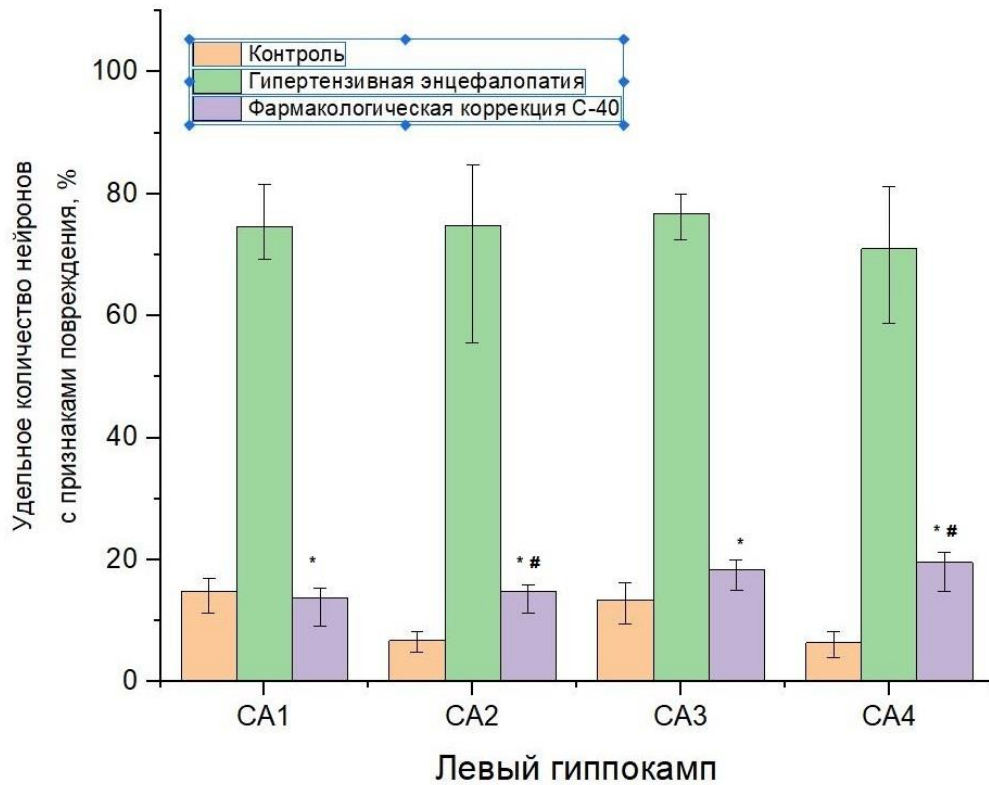
Рисунок 57. СА1 гиппокампа крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии и фармакологической коррекции глиатилином (а) и крысы из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии без фармакологической коррекции (б)

В зоне СА2 при качественном анализе отмечены похожие изменения, при этом отек носил более выраженный характер по сравнению с СА1, что наблюдалось в гиппокампе как левого, так и правого полушария. Среди нейронов пирамидного слоя большинство перикарионов имели правильную, близкую к округлой форму и четко визуализируемые контуры. Количество нейронов с признаками повреждения составило в данной зоне 14,9 % [11,3;16] в левом гиппокампе и 18,5 % [14;20,8] в правом (Рисунок 59). Удельная плотность перикарионов в левом – 32,3 % [27,8;34,3], в правом 34,5 % [31;36,9] (Таблица 9).

Зона СА3 при качественном анализе характеризовалась типичным строением с четким делением на пирамидный, молекулярный и полиморфный

слои, с характерным клеточным составом. В пирамидном слое обнаруживались крупные перикарионы клеток, в большинстве которых определялось округлое ядро и ядрышко. Среди нейронов с признаками повреждения большинство составляли клетки с тотальной гиперхромией, встречались единичные клетки с пикнотической деформацией. Отек в данной зоне носил визуально менее выраженный характер, чем в СА1 и СА2, наиболее выраженный перицеллюлярный отек отмечен в полиморфном слое вокруг глиальных клеток. Количество пирамидных нейронов с признаками повреждения составило в гиппокампе левого полушария 18,4 % [15,1;20] и 16% [11,8;18,3] в правом. Удельная плотность перикарионов соответственно для левого и правого гиппокампа составила 29,2 % [24,4;31,3] и 27,7 % [23,4;29,6] (Таблица 9). Сосудистые нарушения, отмеченные в СА3 как в левом, так и в правом полушарии, носили менее выраженный характер по сравнению с СА2 и СА4 и проявлялись в виде полнокровия и стазов.

Для зоны СА4 при качественном исследовании характерно типичное строение с четким делением на слои и клеточным составом. Пирамидный слой построен из рыхло расположенных полиморфных клеток, среди которых встречались нейроны с признаками повреждения от гиперхромии цитоплазмы до клеток-теней с веретеновидной деформацией. Отмечена картина спонгиоза за счет перицеллюлярного и периваскулярного отека. Число нейронов с признаками повреждения составило в гиппокампе левого полушария 19,6 % [14,8;21,3] и 18,8 % [15,9;22] в правом (Рисунок 59). В молекулярном слое микроглиальные элементы и ветвящиеся отростки. К зоне СА4 примыкает компактная полоска гранулярных клеток зубчатой извилины с менее плотным расположением нейронов по сравнению с контролем. Наблюдаемые в микроциркуляторном русле нарушения характеризовались фокальными диапедезами эритроцитов, периваскулярным отеком и полнокровием. Удельная плотность перикарионов пирамидного слоя в гиппокампе левого полушария составила 23,6 % [19,6;25,5] и 22,8 % [18,8;24,1] в правом.



Рисункок 58. Динамика изменения удельного количества нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое гиппокампа левого полушария крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией и фармакологической коррекцией С-40. \* - достоверные различия с экспериментальной группой, # - достоверные различия с контрольной группой (критерий Краскелла-Уоллиса).

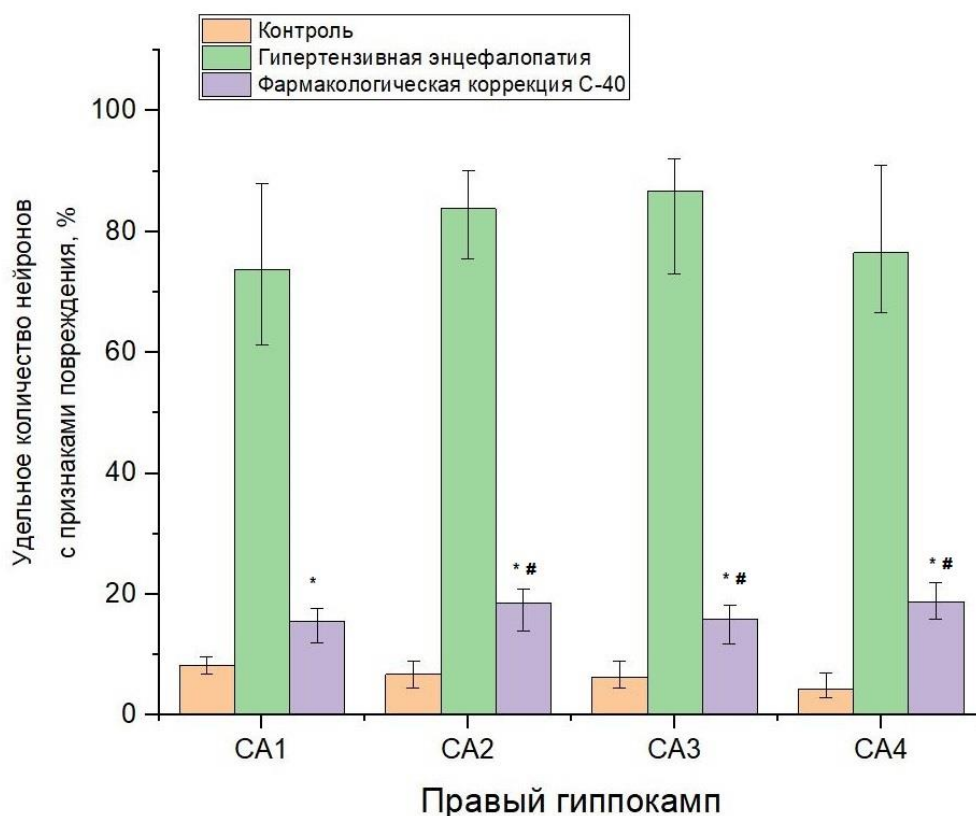


Рисунок 59. Динамика изменения удельного количества нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое гиппокампа правого полушария крыс с моделируемой гипертонической энцефалопатией и фармакологической коррекцией С-40. \* - достоверные различия с экспериментальной группой, # - достоверные различия с контрольной группой (критерий Краскелла-Уоллиса).

Таблица 9. Морфометрические показатели гиппокампа крыс, получавших С-40

Параметр	Левый гиппокамп				Правый гиппокамп			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Удельное количество гиперхромных нейронов, %	13,8 [9,2;15,3] ***	14,9 [11,3;16] ***	18,4 [15,1;20] ***	19,6 [14,8;21,3] ***	15,6 [12,6;17,6] ***	18,5 [14;20,8] ***	16 [11,8;18,3] ***	18,8 [15,9;22] ***
Средняя площадь перикариона нейрона, мкм <sup>2</sup>	98,9 [91,4;106,1]*	90 [78,9;101,8]	116,4 [93,6;144,9]	85,6 [66,6;105,1]	85,6 [77,1;95,3]	124,8 [98,1;153,9]	117,5 [105,7;122,8]	80 [65,5;100,8]*

## Окончание таблицы 9

Параметр	Левый гиппокамп				Правый гиппокамп			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Средняя площадь ядра нейрона, мкм <sup>2</sup>	61,5 [49,8;71,3]	63,5 [46,6;77,7]	91 [70,2;101,5]**	43,2 [33,7;59,5]	59,8 [50,3;72,6]	88,5 [64;107,6]	90,7 [81,1;98,5]	50,1 [39,3;72,8]
Удельная плотность перикарионов, %	30,8 [27,5;32,3]*	32,3 [27,8;34,3]	29,2 [24,4;31,3]	23,6 [19,6;25,5]	29,6 [25;31,7]	34,5 [31;36,9]**	27,7 [23,4;29,6]	22,8 [18,8;24,1]

Примечание. \*\*\* -  $p < 0,001$  – различия достоверны по сравнению с экспериментальной группой, \*\* -  $p < 0,01$  – различия достоверны по сравнению с экспериментальной группой; \* -  $p < 0,05$  – различия достоверны по сравнению с экспериментальной группой (использован критерий Манна-Уитни).

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на многочисленные исследования, цереброваскулярные болезни остаются на сегодня одной из важнейших медицинских и социальных проблем [40, 52, 55]. Неуклонный рост заболеваемости артериальной гипертензией в сочетании с церебральным атеросклерозом, как главных факторов возникновения и прогрессирования ЦВБ, диктует необходимость дальнейшего изучения патофизиологических особенностей повреждения различных структур головного мозга [28, 40, 48]. Безусловный интерес в исследованиях связан не только с поиском потенциальных фармакологических и терапевтических мишеней для борьбы с острыми формами ЦВБ, но и детализацией патогенетических аспектов хронической ишемии головного мозга. Длительно развивающиеся, прогрессивные формы ЦВБ зачастую становятся причиной инвалидизации, стойкой утраты трудоспособности и снижения качества жизни больных [18, 28, 52]. Употребляемый в отечественной литературе термин «дисциркуляторная энцефалопатия» опирается на клинические проявления цереброваскулярной патологии и в первую очередь на снижение когнитивных функций, в связи с чем роль отдельных лимбических структур в развитии и прогрессировании дементных нарушений необходимо всесторонне изучать. В литературе на сегодняшний день имеется большое количество исследований, описывающих структурные изменения в головном мозге крыс при моделировании различных форм ишемии головного мозга [45, 66, 105]. Нужно отметить, что реакция отделов головного мозга на ишемию неодинакова и широко варьирует в зависимости от степени и продолжительности. Гиппокамп по данным литературы является одной из наиболее уязвимых структур головного мозга к различным повреждающим воздействиям, в том числе к ишемии [17, 38, 50, 169]. Гиппокамп – компонент лимбической системы, важная структура в формировании и регуляции когнитивных навыков [38, 160]. По одной из классификаций гиппокамп вместе с обонятельной корой отнесен к древней коре (археокортекс), по другой классификации - к старой (палеокортекс),

расположен в глубине полушарий головного мозга и формирует с соседними областями так называемую гиппокампальную формацию, в которую также входят зубчатая извилина и субикулум [8, 26]. Среди множества функций гиппокампа: пространственное ориентирование, участие в механизмах обучения и памяти, участие в поведенческих реакциях, формировании эмоций и другие [10, 137].

Гипертензивная энцефалопатия входит в группу цереброваскулярных болезней, и в сочетании с атеросклеротической болезнью является одной из наиболее распространенных причин когнитивных дисфункций, что делает ее актуальной проблемой не только экспериментальной и клинической медицины, но и общественно значимой медико-социальной проблемой [3, 9]. В связи с этим особую актуальность приобретает изучение гиппокампа как парной структуры, вовлеченной в формирование и регуляцию когнитивных функций и эмоциональной сферы, поскольку в литературных источниках имеются сведения о неравномерном повреждении не только между зонами, но и в гиппокампе правого и левого полушарий при моделировании ишемии головного мозга и гипоксическом повреждении нейронов [4, 54, 110]. Литературные данные о межполушарной асимметрии повреждения в гиппокампе, а также потенциалу влияния на адаптационные и компенсаторно-приспособительные процессы в гиппокампе правого и левого полушарий являются противоречивыми. Так, имеются сообщения, что преобладающее в правополушарном гиппокампе повреждение приводит к более выраженным поведенческим изменениям, повышению агрессии, повышению артериального давления, а также к увеличению смертности до 50% по сравнению с преобладающим повреждением гиппокампа левого полушария [4, 36]. Выявленное нами увеличение удельного количества нейронов с признаками повреждения в группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией достоверно отличалось от контроля во всех зонах гиппокампа как левого, так и правого полушария, при этом несколько более выраженное повреждение пирамидных нейронов отмечено в гиппокампе правого

полушария. Для пирамидного слоя СА1 гиппокампа левого полушария количество нейронов с признаками повреждения увеличилось на 59,7 % ( $p < 0,01$ ), в правом количество поврежденных нейронов увеличилось на 65,5 % ( $p < 0,001$ ); в пирамидном слое СА3 соответственно удельное количество нейронов с признаками повреждения возрастало на 63,3% ( $p < 0,01$ ) в левом, а в правом на 80,4% ( $p < 0,01$ ). Подобная тенденция характерна и для СА2 и СА4, где также преобладало правополушарное повреждение. Так, в СА2 удельное количество пирамидных нейронов с признаками повреждения увеличивалось в гиппокампе левого полушария на 68% ( $p < 0,001$ ), а в правом полушарии на 77% ( $p < 0,001$ ); а в СА4 на 64,6% и 72,1% соответственно в гиппокампе левого и правого полушарий. При этом, для пирамидного слоя гиппокампа левого полушария крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией были характерны более выраженные атрофические изменения, чем для гиппокампа правого полушария. Изменения средней площади перикариона пирамидного нейрона выявлены в левом гиппокампе во всех зонах, тогда как в правом гиппокампе этот показатель достоверно снижался лишь в СА1 и СА3. Кроме того, в пирамидном слое гиппокампа левого полушария головного мозга крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией удельная плотность перикарионов пирамидных нейронов достоверно снижалась также во всех зонах, а в гиппокампе правого полушария в СА4 достоверной разницы обнаружено не было. Несимметричность дегенеративных процессов также подтверждается межполушарными отличиями в показателях ширины пирамидного слоя, который достоверно изменялся в гиппокампе левого полушария в СА2, СА3 и СА4, а в гиппокампе правого полушария лишь в СА2. По нашему мнению, возникающие в гиппокампе обоих полушарий головного мозга крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией глубокие дегенеративные изменения, заключающиеся в процессах обратимого и необратимого повреждения, а также атрофические изменения, связаны в первую очередь с развитием и персистенцией выраженного периваскулярного и перицеллюлярного отека. Используемое для моделирования гипертензивной



энцефалопатии гравитационное воздействие выступает физическим фактором, существенным влияющим на систему кровообращения и функциональное состояние головного мозга. Негативные эффекты, возникающие вследствие продольных перегрузок связаны с гемоциркуляторными сдвигами, а их выраженность зависит от направления ускорения, его силы, продолжительности, систематичности воздействия, а также градиента нарастания. При комбинировании физических характеристик отрицательных продольных перегрузок, обуславливаемые ими эффекты способны оказывать как положительные, так и негативные воздействия [56, 142, 183]. Безусловно отрицательные эффекты характерны для многократно повторяющихся длительных воздействий в продольном направлении в кранио-каудальном векторе (положительные продольные перегрузки), и на их основе была предложена модель тотальной ишемии головного мозга [29, 31]. Продольные перегрузки в обратном, каудо-краниальном векторе (отрицательные продольные перегрузки) могут вызвать более существенное повреждение головного мозга в связи с тем, что защитные приспособительные механизмы при данном типе воздействий гораздо менее эффективны [12, 146]. Мы полагаем, что однократное воздействие отрицательных продольных перегрузок величиной 9G на протяжении 5 минут приводит к срыву ауторегуляции мозгового кровотока, усиленному артериальному притоку, затруднению венозного оттока и подъему давления в церебральных артериях. Резкий подъем давления в сосудах головного мозга служит причиной нарушения функции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и увеличения проницаемости стенок капилляров. Однако, развивающиеся в стенках сосудов микроциркуляторного русла адаптивные изменения, связанные с плазморрагией, после однократного воздействия, являются обратимыми, а признаки повреждения нейронов не резко выраженными. В функциональных тестах однократное воздействие отрицательных продольных перегрузок величиной 9G сопровождается развитием когнитивных и поведенческих нарушений, однако при отсутствии повторных воздействий наблюдалось

постепенное их затухание. На наш взгляд, однократное воздействие приводит главным образом к обратимому повреждению в сосудистой стенке, которое нарастает по мере повторения воздействий, проходя от этапа альтеративных изменений к деструкции (вплоть до циркулярных фибриноидных некрозов, а также полной облитерации стенок сосудов) и компенсаторно-приспособительной реорганизации. Нарастающие при повторных длительных отрицательных продольных перегрузках дегенеративные изменения сосудистых стенок служат основой дисфункции ГЭБ и персистенции отека головного мозга и обуславливают выявленную нами картину спонгиоза [175, 184, 201]. Выраженный перицеллюлярный и периваскулярный отек с нарастанием сосудистых изменений усугубляет клеточную гипоксию и служит главным фактором отсроченного клеточного повреждения и гибели. В предшествующих экспериментах нами было выявлено, что спустя 2 недели моделирования гипертензивной энцефалопатии методом отрицательных продольных перегрузок отек носил гораздо менее выраженный характер, а число поврежденных нейронов в пирамидном слое гиппокампа увеличивалось не столь значительно, как уже спустя 4 недели. Примечательно, что к 8 неделе воздействия, число пирамидных нейронов с признаками повреждения во всех зонах пирамидного слоя гиппокампа также оказалось значительно меньше, чем на 4 неделе. По всей видимости, среди нейронов, несущих признаки повреждения, преимущественно гиперхроматоз ядра и цитоплазмы, большинство может быть расценено как обратимо поврежденные и, вероятно, адаптируются к условиям нарастающего отека. В современной литературе нет единого мнения относительно однозначности оценки обратимости или необратимости повреждения. По классическим представлениям, необратимо поврежденными считаются клетки-тени. Гипохроматоз расценивается как резкое повышение синтетической функции в системе ДНК-РНК-белок и большинство авторов считают, что подобное перенапряжение в условиях продолжающейся клеточной гипоксии и развивающегося эксайтотоксического эффекта в дальнейшем приводит к гибели нейронов [32,

54, 153, 155]. Гиперхромные нейроны, в свою очередь, считаются клетками со сниженной белковосинтетической функцией, своего рода «замороженным» состоянием нейрона, и дальнейшая судьба нейронов с подобными признаками повреждения должна оцениваться комплексно, с учетом не только структурно-функциональных изменений, но и с позиций изменений в фенотипе маркеров клеточной гибели/аутофагии [20, 21, 46, 54, 126, 155]. Выявленная нами асимметрия повреждения в гиппокампе крыс в условиях моделируемой гипертензивной энцефалопатии на наш взгляд связана как с межполушарными различиями в организации нейро-глио-сосудистых комплексов, индивидуальными особенностями васкуляризации, так и со спецификой оказываемого воздействия [47, 54]. Помимо ускорения в каудо-краниальном векторе, на гемодинамические нарушения также оказывает влияние центростремительное ускорение, возникающее во время перегрузок и с ним может быть связано неравномерное перераспределение крови между левым и правым полушариями, смещению и депонированию крови в полушарии, противоположном направлению движения.

При моделировании стеноза сонных артерий в пирамидном слое гиппокампа крыс также наблюдалось асимметричное повреждение. Несмотря на отчетливую тенденцию в остальных зонах, достоверное увеличение удельного количества нейронов с признаками повреждения отмечено в гиппокампе левого полушария лишь в СА1 на 8,5% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем, тогда как в правом достоверное увеличение наблюдается в СА1 и СА3 соответственно на 23% ( $p < 0,001$ ) и на 8,7 % ( $p < 0,01$ ), что соотносится с литературными данными, описывающими эти зоны как наиболее подверженные повреждению в моделях глобальной, неполной и фокальной ишемии [1, 132]. Отличия реакции и динамики изменений пирамидных нейронов и нейропиля в ответ на ишемию различного генеза в разных зонах гиппокампа объясняются рядом факторов. Среди них: метаболические особенности, отличия в устойчивости к клеточной гипоксии, различная функциональная активность пирамидных нейронов в разных зонах

гиппокампа как в норме, так и при патологических процессах. Сообщается о разной степени васкуляризации, вариабельности относительной площади капилляров, различиях в длине микроциркуляторных сосудов зон СА1 и СА3 по сравнению с зонами СА2 и СА4, а также в гиппокампе левого и правого полушарий, с чем, по-видимому, связаны менее выраженные компенсаторные способности зон СА1 и СА3 правого гиппокампа в условиях моделируемого стеноза сонных артерий [1, 16, 54].

Важным наблюдением является структура признаков повреждения пирамидных нейронов в гиппокампе крыс с моделируемым стенозом – большая из них могут быть охарактеризованы как обратимо поврежденные, так как главным признаком повреждения выступал гиперхроматоз ядра и цитоплазмы, встречались лишь единичные клетки-тени. Несмотря на достоверное уменьшение средней площади перикарионов пирамидных нейронов в СА1 и СА4 гиппокампа левого полушария и СА4 гиппокампа правого полушария крыс с моделируемым стенозом сонных артерий, достоверных отличий в ширине пирамидного слоя ни в одной из зон выявлено не было. У крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией достоверное увеличение ширины пирамидного слоя отмечено в СА2, СА3 и СА4 гиппокампа левого полушария, а также в СА2 правого. На наш взгляд, различия в ширине пирамидного слоя у крыс из разных групп моделирования ЦВБ обуславливаются в первую очередь разной выраженностью перицеллюлярного и периваскулярного отека, а кроме того различиями в реакции астроцитарной глиии и смещением нейроглиального отношения с увеличением удельной плотности нейропиля. За счет более выраженного отека в гиппокампе крыс в условиях моделируемой гипертензивной энцефалопатии, нейроны пирамидного слоя оказывались менее плотно прилежащими друг к другу, чем в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий, где отек носил умеренный характер. Менее компактное расположение нейронов ввиду выраженного отека, а также активация глиоза и достоверное увеличение удельной плотности нейропиля во

всех зонах гиппокампа левого, а также в CA1 и CA2 гиппокампа правого полушария служат, по нашему мнению, причиной увеличения ширины пирамидного слоя CA2, CA3 и CA4 левого и CA2 гиппокампа правого полушария крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии [54, 70, 175].

Реакция нейроглии во многом определяется генезом ишемии, степенью ее тяжести, и оказывает влияние на адаптивные процессы, существенно изменяя течение заболевания [22, 27]. Разнонаправленность реакции астроцитарной глии на ишемию проявляется как участием в нейропротективных процессах, так и развитием нейровоспаления, замедлением процессов регенерации и участием в отсроченной гибели нейронов [11, 30]. Во многом, концепция астроглиоза как сугубо отрицательного процесса была пересмотрена в последние годы, когда роль астроцитов в ишемическом каскаде, а также их участие в модуляции синаптической пластичности, глиотрансмиссии и ангиогенезе была значительно дополнена исследователями [22, 30, 173]. Описывается функциональная гетерогенность астроцитов как в норме, так и при ишемии головного мозга: степень вовлеченности в межклеточные взаимодействия, синтез и экспрессия маркеров воспаления, трофическое обеспечение реактивно измененных нейронов зависят от удаленности астроцитов от ядра ишемии, давности и тяжести гипоксии [23, 173, 180]. Было показано, что в острой фазе ишемического поражения наблюдается снижение плотности астроцитарной глии, а для отдаленных сроков ишемии, так же, как и для хронической ишемии головного мозга характерно увеличение числа астроцитов и гипертрофия их отростков [11, 173]. При этом, для перифокальной зоны ишемии характерны несколько морфологических типов астроцитов, выполняющих различные функции: транзиторноактивированные астроциты (с умеренным изменением профиля астроцитарных белков), рубцеобразующие поляризованные астроциты (с выраженным перераспределением маркерных белков и перестройкой отростков), интактные

астроциты [11, 30]. Выявленное нами достоверное увеличение относительной площади GFAP-позитивного материала в пирамидном слое CA2 на 8,9% ( $p < 0,001$ ) и в CA4 на 6,9 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем, на наш взгляд свидетельствует об увеличении числа активированных астроцитов и выступает признаком развивающегося астроглиоза в этих зонах у крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. В то же время, при моделировании стеноза сонных артерий, нами было выявлено достоверное усиление экспрессии GFAP в CA2 на 6,3 % ( $p < 0,01$ ), в CA3 на 6,6 % ( $p < 0,001$ ) и CA4 на 4,1 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем, что согласуется с данными литературы, описывающими подобный астроглиальный ответ у крыс линии SP-SHR и на модели глобальной ишемии головного мозга [104, 182, 190, 197]. Согласно литературным данным, астроглиоз – это универсальный и типичный ответ головного мозга на повреждение, однако в зависимости от механизма повреждения, тяжести и продолжительности повреждающего воздействия, выделяют несколько типов астроглиоза. Для медленно нарастающих изменений, нейродегенеративных болезней, характерен изоморфный тип астроглиоза без перекрытий астроцитарных доменов и без значительного ремоделирования астроглиальных сетей. Для острого повреждения головного мозга с массовой гибелью нейронов в ядре ишемии и отсроченной гибелью в пенумбре характерен анизоморфный тип астроглиоза с нарушением доменной организации астроцитов и формированием глиального рубца [11, 24, 39, 177]. Выявленное нами усиление экспрессии в CA2 и CA4 пирамидного слоя крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией сопровождалось более рыхлым расположением перикарионов нейронов на фоне отека, а также смещением GFAP-позитивных астроцитов из краевого и молекулярного слоев и свободным расположением тел астроцитов между пирамидными нейронами. В группе крыс с моделируемым стенозом сонных артерий достоверное усиление экспрессии GFAP в CA2, CA3 и CA4 не сопровождалось смещением тел астроцитов с периферии в пирамидный слой, при этом наблюдалось усиленное ветвление

отростков между перикарионами пирамидных нейронов. Мы полагаем, что в гиппокампе крыс из обеих экспериментальных групп развивается реактивный астроглиоз, имеющий адаптивный характер и направлен как на формирование глиального рубца и ограничение зоны поражения, так и на трофическую поддержку нейронов в условиях ишемии и нарастающего отека. На наш взгляд, различия в характере глиоза при моделировании стеноза сонных артерий и моделировании гипертензивной энцефалопатии объясняются различиями в выраженности повреждения. Так, в условиях моделируемой гипертензивной энцефалопатии выявлено более выраженное увеличение удельного количества нейронов с признаками повреждения и более выраженный отек, чем в группе с моделируемым стенозом сонных артерий. Компактный астроглиоз с явлениями значительного ремоделирования астроцитарных доменов, появлением тел астроцитов в участках селективного выпадения нейронов и между перикарионами нейронов, несущих признаки повреждения расценивается как направленный на гомеостатическую поддержку и обеспечивающий выживаемость поврежденных пирамидных нейронов. В пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий характерен диффузный глиоз с усиленным ветвлением и гипертрофией отростков астроцитов, что согласуется с данными литературы, описывающими для моделей ишемии головного мозга как изоморфный, так и анизоморфный типы астроглиоза [11, 30, 173]. Выявленное нами достоверное увеличение относительной площади GFAP-позитивного материала в СА2, СА3 и СА4 пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемым стенозом, а также в СА2 и СА4 в сочетании с выявленным морфометрически достоверным увеличением удельной площади нейропиля во всех зонах левого, СА1 и СА2 правого гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией свидетельствует о большем астроцитарном охвате и ремоделировании доменов с нарушенной синаптической пластичностью. Ремоделирование астроцитарных доменов тем более важный феномен при разных формах ЦВБ у человека, поскольку у человека, в отличие от грызунов ниже соотношение

нейронов/глиальных компонентов, а также протоплазматические астроциты имеют большее число первичных отростков и более сложную структуру ветвления, тем самым более подвержены нарушению синаптической пластичности [11, 101, 177].

Известно, что посредством глиотрансмиссии астроциты способны модулировать синаптическую пластичность как в норме, так и при патологии [59, 75]. Ассоциация астроцитарных отростков и синапсов – динамический процесс, который обладает высоким терапевтическим потенциалом, ввиду мультимодальности глиотрансмиттеров. Среди основных глиотрансмиттеров выделяют класс аминокислот (глутамат, D-серин), класс нуклеотидов (АТФ), также в астроцитарной глии синтезируются газовые транмиттеры (в частности, NO) [148]. Мультимодальность глиотрансмиттеров проявляется разнонаправленностью эффектов – от нормальной нейропластичности и обеспечения физиологического функционирования системы нейрон-глия-сосуд до участия в механизмах вторичного повреждения при патологических процессах, в том числе при церебральной ишемии [75, 166, 172]. Безусловный интерес связан с изучением степени участия возбуждающих транмиттеров в универсальном механизме вторичного повреждения нейронов в условиях ишемии – эксайтотоксичности. Принимая во внимание вовлеченность глутамата и D-серина в активацию NMDAR, представляется перспективным изучение возможности участия этих транмиттеров в механизмах вторичного повреждения [116, 166, 198]. Уникальность NMDA-опосредованной рецепции в зависимости NMDAR от одновременного связывания двух агонистов – нейротрансмиттера глутамата и коагониста D-серина. Роль D-серина в патологии ЦНС неоднозначна – в физиологических условиях этот транмиттер обеспечивает нормальную нейропластичность, однако при снижении или усилении его синтеза развиваются патологические процессы. Главным регулятором синтеза D-серина в головном мозге выступает сериновая рацемаза (CP) – фермент, обеспечивающий превращение L-серина в D-серин [73, 152]. При этом, согласно «шаттл-сериновой» концепции, в нормальных



условиях неактивированные астроциты синтезируют L-серин из глюкозы, а затем транспортируют его в нейроны, где при участии CP L-серин переводится в D-серин, таким образом в нормальных условиях CP экспрессируется практически исключительно в нейронах [62, 73, 116]. При патологии и развитии нейровоспаления усиливается нейрональная экспрессия CP, а также CP экспрессируется в реактивных астроцитах, где включается непосредственная рацемизация L-серина в D-серин. Сопряженный с повышением активности CP, избыточный синтез D-серина ряд исследователей связывают с усилением действия глутамата на NMDAR и развитием эксайтотоксического действия [62, 73, 140]. CP – потенциально многообещающая мишень для фармакологического воздействия и обеспечения нейрональной выживаемости в условиях ишемии. На модели окклюзии средней мозговой артерии у крыс линии SR -/- (ингибция CP), было продемонстрировано уменьшение объема инфаркта на 50%, а нейрональные культуры крыс SR -/- продуцируют на 60% меньше NO [73, 140]. Выявленные нами особенности экспрессии CP-позитивного материала имели общие черты как в группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией, так и в группе крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. Достоверное изменение относительной площади иммунопозитивного материала было выявлено лишь в CA1 пирамидного слоя – в группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией на 5,5% ( $p < 0,05$ ), а в группе крыс с моделируемым стенозом сонных артерий на 6,4% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. При этом, в экспериментальных группах отмечена разница в характере экспрессии – в группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией достоверное увеличение относительной площади CP-позитивного материала сопровождалось усилением интенсивности до 3 баллов, а также транслокацией CP-позитивного материала в отростки пирамидных нейронов. Особенности экспрессии CP, по нашему мнению, связана с большей чувствительностью CA1 к ишемическому повреждению и возможным вовлечением в этот процесс механизма эксайтотоксичности с

гиперактивацией NMDAR. Дисфункция D-серин опосредованной NMDA-рецепции в зоне CA1, служит, на наш взгляд, дополнительным фактором отсроченного повреждения пирамидных нейронов, утяжеляя функциональные нарушения и когнитивные расстройства в обеих экспериментальных группах. С другой стороны, отсутствие достоверной разницы для CA2 зоны и тенденция к снижению уровня экспрессии CP в CA4 зоне могут объяснять более высокую относительную устойчивость пирамидных нейронов к гипоксии в данных зонах по сравнению с CA1 [5, 140, 166]. Более выраженная степень экспрессии CP в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией, чем в группе моделируемого стеноза, а также транслокация CP-позитивного материала в дендритные отростки пирамидных нейронов радиального слоя CA1 и в усиленно извитые отростки пирамидных нейронов CA2 объясняется различием в силе повреждения. Более выраженные признаки повреждения, обнаруженные в группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией могут быть связаны с большей активностью CP при кратковременном сильном, но повторяющемся воздействии [73, 116, 140]. В литературе имеются сведения о механизме перемещения цитозольного фермента к плазматической мембране/дендриты нейронов, что обеспечивает ингибирование активности CP и предупреждает образование избытка D-серина [116, 140]. Наблюдаемая нами транслокация CP-позитивного материала согласуется с данными литературы и направлена на ограничение NMDAR-опосредуемого избыточного действия глутамата и эксайтотоксичности при моделировании гипертензивной энцефалопатии.

Выполненное нами исследование демонстрирует более важную роль iNOS (индуцибельная нитрооксидсинтаза) в образовании NO при моделируемой гипертензивной энцефалопатии и моделируемом стенозе сонных артерий, чем другие изоформы NO-синтаз. Обнаруженное нами достоверное увеличение относительной площади iNOS-позитивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом в CA1 на 7,4 % ( $p < 0,001$ ) и в CA2 на 8,5 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем,

сопровождалось отсутствием достоверных отличий в экспрессии nNOS и eNOS во всех зонах. При этом необходимо отметить явную тенденцию к снижению экспрессии eNOS в каждой из зон, что вероятно связано с возникающими адаптивными изменениями сосудистой стенки при длительной ишемии. При моделировании гипертензивной энцефалопатии относительная площадь iNOS-позитивного материала достоверно увеличивалась в пирамидном слое всех зон, но максимально в СА3 – на 8,3 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольными животными, при этом также не было выявлено значимых отличий в степени экспрессии nNOS и eNOS. Слабая выраженность экспрессии nNOS как в группе контрольных, так и в обеих экспериментальных группах крыс связана с особенностями функционирования этой изоформы NO-синтаз в физиологических условиях и при ишемии [41, 185]. Известно, что в норме nNOS может быть обнаружен лишь в 1-2% нейронов, имеющих сложное ветвление отростков, выступающих таким образом «донатором» синтезированного NO для находящихся вблизи клеток, не экспрессирующих этот фермент [41, 86]. В литературе имеются данные об обратной взаимосвязи действия и эффектов nNOS и iNOS при моделировании фокальной ишемии путем окклюзии средней мозговой артерии. У крыс, которые демонстрировали низкую степень когнитивных и неврологических нарушений и высокую сохранность рефлексов, регистрировалась повышенная экспрессия nNOS, в то же время iNOS-иммунопозитивные клетки отсутствовали. И наоборот, у животных с выраженными неврологическими и когнитивными нарушениями доминировали iNOS-иммунопозитивные клетки, тогда как nNOS-реактивные клетки не обнаруживались. Микроглия была активирована как в группе крыс с низким баллом по шкале неврологической оценки, так и у животных с высоким баллом, однако только во второй группе микроглиальные клетки оказывались iNOS-позитивными [185]. Мы полагаем, что выраженное повреждение, развивающееся при моделировании гипертензивной энцефалопатии служит фактором нарушения функционирования ГЭБ, формирования отека, последующего приобретения астроцитарной и

микроглией провоспалительного фенотипа и переключением с конститутивного типа синтеза NO на преимущественно индуцибельный, связанный с угнетением nNOS и активированием iNOS [41, 124, 185]. Более выраженное повреждение в группе моделируемой гипертензивной энцефалопатии по сравнению с группой моделируемого стеноза сонных артерий может быть связано с более выраженной экспрессией iNOS, достоверно усилившейся во всех зонах пирамидного слоя гиппокампа, и более существенной роли iNOS-опосредованного повреждения при моделировании гипертензивной энцефалопатии. Оксид азота может выполнять как нейропротективную, так и нейротоксическую роль, что определяется типом синтезирующих его клеток, изоформы NO-синтазы, стадией и удаленностью от ядра ишемии. В физиологических условиях, продуцируемый eNOS и nNOS оксид азота предотвращает повреждение нейронов, участвует в регуляции мозгового кровотока и нейропластичности. Переключение синтеза NO с конститутивного на индуцибельный с участием iNOS при ишемии влечет за собой чрезмерную продукцию NO и его неблагоприятные эффекты: прогрессирование первичного повреждения, эксайтотоксичность, нейровоспаление и клеточная гибель. Мы предполагаем, что достоверное увеличение относительной площади iNOS-позитивного материала в пирамидном слое CA1 и CA2, тенденция к увеличению в CA3 и CA4 гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий, а также изменение характера экспрессии на резко выраженную в сочетании с отсутствием изменения экспрессии nNOS и eNOS свидетельствует о нарушенной функции NO, избыточном его синтезе, последующим накоплением пероксинитрита и развитием как обратимого, так и необратимого клеточного повреждения [41, 125, 185].

Сигнальные пути инициации некроза и регулируемой клеточной гибели при ишемическом повреждении имеют много общих механизмов, изучение которых сегодня находится в поле интересов исследователей. Понимание тонких механизмов реализации необратимого повреждения и нейрональной

смерти – ключевая основа в поиске терапевтических мишеней и предупреждении вторичного повреждения и прогрессирования когнитивных и моторных нарушений при ЦВБ [74, 67, 87, 139]. Известно, что высокие концентрации NO и продуктов его нарушенного метаболизма могут служить иницирующим клеточную смерть фактором. При этом, реализация того или иного вида гибели зависит во многом от энергетического состояния нейрона – при дефиците АТФ на этапе эффекторных каспаз, клетка погибает путем некроза [43, 87, 141, 157]. Выявленное нами отсутствие экспрессии каспазы-3 может свидетельствовать о меньшей роли каспаза-зависимого апоптоза в гибели пирамидных нейронов в гиппокампе крыс как при моделировании гипертензивной энцефалопатии, так и при моделировании стеноза сонных артерий. В литературе приводятся противоречивые данные относительно участия каспазы-3 в апоптозе при ишемии головного мозга [1, 141, 157]. Имеются публикации, в которых сообщается, что среди гипоксически поврежденных нейронов лишь менее 10% экспрессируют каспазу-3, что говорит о ее ограниченном участии в нейрональной смерти [1]. В других исследованиях сообщается о исключительной роли каспаза-независимого апоптоза при ряде цереброваскулярных болезней [53]. В последние годы функции каспазы-3 как в физиологических условиях, так и при ишемии головного мозга были во многом переосмыслены. Восприятие этого фермента лишь сугубо как компонента завершающей стадии апоптоза на сегодня представляется утратившим актуальность – описано участие каспазы-3 в обеспечении нормального синаптогенеза, функционирования системы нейрон-глия и ишемического прекодиционирования [1, 192]. Сегодня известно, что помимо реализации каспаза-зависимого апоптоза, каспаза-3 вовлечена в нормальную нейропластичность и ее ингибирование не дает положительных результатов при цереброваскулярной патологии, а кроме того каспаза-3 выступает в роли антагониста AIF (apoptosis inducing factor, апоптоз-индуцирующий фактор) [87, 141, 192]. Выявленное нами увеличение относительной площади AIF-позитивного материала в CA1 на 2,7 % ( $p < 0,01$ ),

в СА2 на 2,5 % ( $p < 0,05$ ) и в СА4 на 2,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем при моделировании гипертензивной энцефалопатии в сочетании с усилением интенсивности экспрессии до 2 баллов свидетельствует, по нашему мнению, о развитии необратимых изменений и активации каспаза-независимого апоптоза в этих зонах. При моделировании стеноза сонных артерий достоверное увеличение относительной площади AIF-позитивного материала обнаружено в СА1 – на 3,1% ( $p < 0,001$ ) и в СА3 – на 2,8% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем, при этом интенсивность реакции также усиливалась до 2 баллов. Для обеих экспериментальных групп характерны невысокие значения относительной площади, что свидетельствует на наш взгляд о смешанной природе необратимых изменений с участием AIF-индуцированного апоптоза и возможным участием иных путей клеточной гибели при моделировании гипертензивной энцефалопатии и стеноза сонных артерий, что согласуется с данными литературы [53, 78, 87, 189]. Учитывая, что выделяют два пула AIF: цитозольный и митохондриальный, с разными апоптогенными способностями, требуется всесторонний анализ экспрессии этого медиатора в связи с другими маркерами клеточной гибели, аутофагии и белков, влияющих на стабильность митохондриальной мембраны [186, 188]. Высвободившийся из митохондрий при повышении проницаемости ее мембраны, AIF при участии PARP транслоцируется к ядру, где обеспечивает необратимую деградацию хроматина и гибель клетки [61, 199]. Один из ключевых участников пермеабиллизации митохондриальной мембраны – проапоптотический белок bax из суперсемейства bcl-2-белков [79, 91, 150]. В физиологических условиях большинство молекул bax находятся в виде цитозольных мономеров, содержащих в структуре белка NH<sub>2</sub>-концевую альфа-спираль  $\alpha 1$  и COOH-концевую спираль  $\alpha 9$  [91, 141, 150]. При патологических процессах, получаемый апоптогенный стимул и взаимодействие концевой спирали  $\alpha 9$  с инициатором приводит к нацеленности bax на внешнюю митохондриальную мембрану и после транслокации к ней, с помощью концевой спирали  $\alpha 1$  олигомеризуется и/или совместно с

проапоптотическим белком bax формирует поры [79, 138, 191]. Последующий за повышением проницаемости наружной митохондриальной мембраны и ремоделированием крист выход ряда проапоптотических медиаторов (цитохром C, AIF) и дальнейшие каскадные взаимодействия реализуют внутренний путь апоптоза по каспаза-зависимому или каспаза-независимому механизмам [98, 138]. Обнаруженное нами достоверное увеличение относительной площади bax-позитивного материала на 0,7% ( $p < 0,001$ ) в пирамидном слое CA1 гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий свидетельствует, по нашему мнению, о вовлеченности bax в реализацию необратимого повреждения пирамидных нейронов и клеточную гибель в этой зоне. Необходимо отметить, что в экспериментах было продемонстрировано отсутствие снижения апоптоза при изолированном ингибировании bax и целесообразно рассматривать его в контексте изменения динамики экспрессии других родственных белков, таких как bak, bok, bid [76]. Отсутствие достоверных отличий уровня bax от контроля при моделировании гипертензивной энцефалопатии может свидетельствовать о задействовании иных механизмов нарушения митохондриальной проницаемости и запуска внутриклеточного пути апоптоза, что соотносится с данными литературы [74, 87, 133, 157].

В тесной связи с подсемейством проапоптотических белков находится антиапоптотический белок bcl-2, действующий как внутриклеточный блокатор митохондриального пути апоптоза [135, 138, 154]. При моделировании гипертензивной энцефалопатии в пирамидном слое всех зон гиппокампа крыс относительная плотность bcl-2-позитивного материала достоверно увеличивалась по сравнению с контролем, при этом максимально экспрессия усиливалась в CA2 – на 5,6% ( $p < 0,01$ ) и CA4 – на 5,7% ( $p < 0,01$ ). Более высокая активность bcl-2 в этих зонах может выступать одним из факторов большей устойчивости CA2 и CA4 по отношению к CA1 и CA3 [16, 110, 136, 156]. При моделировании стеноза сонных артерий достоверное увеличение bcl-2-позитивного материала отмечено в CA3 на 3,4% ( $p < 0,01$ ) и

CA4 3,1% ( $p < 0,01$ ). С одной стороны, более выраженная экспрессия bcl-2 в группе экспериментальной гипертензивной энцефалопатии по сравнению с группой моделируемого стеноза сонных артерий соотносится с полученными морфометрическими результатами и объясняет более выраженное повреждение и, соответственно, более значимое напряжение механизмов, направленных на обеспечение выживаемости и блокирование нейрональной гибели [133, 136, 156, 202]. Важной особенностью достоверного усиления экспрессии bcl-2 в пирамидном слое всех зон гиппокампа крыс в группе моделируемой гипертензивной энцефалопатии служит одновременное отсутствие достоверной разницы в уровне экспрессии bax, что явно свидетельствует в пользу именно антиапоптотической активности [65, 89, 141, 156]. При моделировании стеноза сонных артерий достоверное усиление bcl-2 в CA3 и CA4 также не сопровождалось изменениями bax, и наоборот – усиление экспрессии bax в CA1 отмечено без изменения уровня bcl-2. Однако, необходимо учитывать, что bcl-2 перекрестно регулирует не только внутренний путь апоптоза, но и посредством конкурентного взаимодействия с BН-3-белками влияет на инициацию аутофагии [138, 154, 191]. Индуцированная аутофагия – предмет дискуссии относительно положительного или негативного эффекта на жизнедеятельность клетки в условиях гипоксии. Один из BН-3-белков – beclin 1, который в неактивном состоянии непосредственно связан с антиапоптотическими гомологами bcl-2/bcl-xl/bcl-w и при диссоциации комплекса участвует в иницировании аутофагии [77, 89, 90, 141]. Mizushima предложил классифицировать аутофагию на базальную, иначе говоря физиологическую, а также индуцированную [89, 135]. Сегодня общепризнанно что в физиологических условиях нейроны демонстрируют низкий уровень синтеза аутофагосом, для которых характерен ретроградный аксональный ток по направлению к телу нейрона, где они сливаются с лизосомами. Для индуцированной аутофагии напротив, характерно антероградное движение лизосом к накапливающимся в аксонах аутофагосомам. При этом интенсификация синтеза сопровождается



усилением экспрессии маркеров зрелых лизосом, например, LAMP-2 (lysosomal-associated membrane protein) [82, 167]. Нарушенная аутофагия проявляется разобщением лизосом и аутофагосом и накоплением дефектных белков и/или продуктов деградации в аксоплазме и последующей аксонопатией и дегенеративным изменением нейронов [89, 135, 200]. Смена базальной аутофагии на индуцированную возможна по нескольким путям, один из которых – расщепление комплекса bcl-2/beclin 1 и связывание beclin 1 с белками Vps34 и Vps15 [89, 200]. Таким образом, можно заключить, что LAMP-2, являясь структурным компонентом зрелых лизосом, принимает участие во всех подтипах аутофагии: шапероновой, микроаутофагии и макроаутофагии, которые могут быть нацелены как на обеспечение выживания нейрона в условиях гипоксии, так и приводить к аутофагической гибели [80, 82, 167]. Beclin 1 является более надежным маркером именно индуцированной аутофагии, причем в отличие от mTOR-индуцированной и обусловленной ER-стрессом, каскад превращений при beclin 1-зависимой аутофагии значительно короче, что может иметь решающее значение при длительной выраженной ишемии и энергетическом истощении нейронов [89, 106, 135]. Выявленное нами достоверное увеличение относительной площади LAMP-2-позитивного материала в пирамидном слое CA1 гиппокампа крыс при моделировании стеноза сонных артерий на 0,8% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем сопровождалось достоверным увеличением относительной площади beclin 1-позитивного материала на 1,1% по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ) в этой же зоне. При моделировании гипертензивной энцефалопатии мы также выявили достоверное увеличение относительной площади beclin 1-позитивного материала в пирамидном слое CA1 и CA2 гиппокампа на 1% ( $p < 0,01$ ) и 0,6 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, при этом относительная площадь LAMP-2-позитивного материала достоверно увеличивалась в CA2 на 1,3% ( $p < 0,01$ ) и в CA4 на 1,5% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем. Мы предполагаем, что при моделировании стеноза сонных артерий и при моделировании гипертензивной энцефалопатии в пирамидных нейронах CA1

гиппокампа крыс включается механизм beclin 1-опосредованной аутофагии, направленных как на реализацию компенсаторных процессов, так и на отдаленную аутофагическую гибель нейронов в условиях ишемии. В пирамидном слое CA2 и CA4 гиппокампа крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии на фоне резкого увеличения удельного количества поврежденных нейронов усиливается экспрессия LAMP-2, что на наш взгляд свидетельствует об активации процессов аутофагии смешанными механизмами и также имеющих разнонаправленный характер [49, 69, 89]. По-видимому, усиление LAMP-2 в CA2 и CA4 может служить одним из факторов большей относительной устойчивости этих зон по сравнению с CA1 и CA3 при патологических процессах, в том числе при ишемии, что соотносится с литературными данными [69, 80]. Несмотря на отсутствие достоверной разницы в уровне экспрессии beclin 1 в пирамидном слое CA3 и CA4 гиппокампа крыс при гипертензивной энцефалопатии, отмечена явная тенденция к увеличению относительной площади иммунореактивного материала. Более выраженные процессы активации аутофагии в гиппокампе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией по отношению к группе моделируемого стеноза сонных артерий могут объясняться более резким увеличением числа поврежденных пирамидных нейронов и соответственно более значительным напряжением компенсаторно-приспособительных механизмов. Учитывая вовлеченность LAMP-2 в том числе в шапероновую аутофагию, трактовать увеличение относительной площади этого маркера можно двояко [82, 92, 165, 167]. С одной стороны, при нарастании отека и клеточной гипоксии, LAMP-2 может стать участником аутофагической гибели нейронов [82, 167]. С другой стороны, при помощи системы белков теплового шока, LAMP-2 длительно обеспечивает функционирование нейрона и адаптивные изменения [69, 80]. Обнаруженное нами достоверное усиление экспрессии Hsp70 во всех зонах и Hsp90 в CA1 пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией, и отсутствие достоверной разницы в группе моделируемого

стеноза подтверждает большее напряжение компенсаторно-приспособительных механизмов при более выраженном повреждении [83, 92, 165]. При моделировании гипертензивной энцефалопатии наиболее значимо относительная площадь Hsp70-позитивного материала увеличивалась в СА1 – на 3,2% ( $p < 0,01$ ) и в СА3 - на 4,9% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем, что также соотносится с данными о большей подверженности нейронов этих зон повреждению. Учитывая непосредственное и опосредованное цитопротективное действие шаперонов, мы предполагаем, что при моделировании гипертензивной энцефалопатии, роль Hsp70 и Hsp90 в выживаемости пирамидных нейронов выше, чем при моделировании стеноза сонных артерий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного нами исследования были получены новые данные о морфофункциональных изменениях, развивающихся в пирамидном слое гиппокампа крыс при экспериментальном моделировании цереброваскулярных болезней. Полученные с применением методов качественной и количественной морфометрической оценки данные существенно дополняют имеющиеся сведения о развитии процессов повреждения, особенностях адаптационных реакций, компенсаторных и нейропротективных способностях гиппокампа как при моделировании гипертензивной энцефалопатии, так и при моделировании стеноза сонных артерий. Результаты иммуногистохимического исследования, в том числе с применением программной количественной морфометрии вносят вклад в понимание особенностей развития процессов обратимого и необратимого повреждения, реализации апоптоза и аутофагии, реакции астроцитарной глии в условиях моделируемого стеноза сонных артерий и гипертензивной энцефалопатии. Выявлено, что многократное воздействие отрицательных продольных перегрузок приводит к повреждению гематоэнцефалического барьера, персистенции периваскулярного и перицеллюлярного отека и значительному увеличению числа клеток с признаками как обратимого, так и необратимого повреждения, сопровождающихся развитием когнитивных и поведенческих нарушений. При моделируемой гипертензивной энцефалопатии увеличение удельного количества пирамидных нейронов с признаками повреждения отмечено во всех зонах гиппокампа, при этом более значительно в гиппокампе правого полушария. Несимметричность повреждения характерна также и для моделируемого стеноза сонных артерий – было отмечено более значительное увеличение числа пирамидных нейронов с признаками обратимого и необратимого повреждения в гиппокампе правого полушария. Отмечена ведущая роль iNOS в образовании NO в пирамидном слое гиппокампа крыс как при моделировании гипертензивной энцефалопатии, так и при моделировании стеноза сонных артерий. Выявлено

участие сериновой рацемазы в опосредовании эксайтотоксического повреждения для CA1 гиппокампа крыс из обеих экспериментальных групп. Наиболее уязвимая зона гиппокампа CA1 характеризовалась значимым увеличением удельного количества пирамидных нейронов с признаками повреждения на фоне активации каспаза-независимых механизмов регулируемой клеточной гибели с усилением экспрессии AIF в обеих экспериментальных группах. Для CA1 гиппокампа крыс с моделируемым стенозом сонных артерий также отмечен bax-зависимый апоптоз. Выявлена большая роль системы белков теплового шока в обеспечении нейрональной выживаемости при моделировании гипертензивной энцефалопатии с усилением экспрессии Hsp70 во всех зонах, а в CA1 совместно с усиленной экспрессией Hsp90. В обеих экспериментальных группах отмечена реактивная реакция астроцитарной глии с приобретением ей провоспалительного фенотипа, усилением экспрессии GFAP и развитием астроглиоза. Глубокие дегенеративные и атрофические изменения в пирамидном слое гиппокампа крыс сопровождалось усилением экспрессии bcl-2 и включением противоапоптотических механизмов защиты нейронов. В обеих экспериментальных группах отмечена активация аутофагии с вовлечением beclin 1-зависимого механизма и усилением экспрессии LAMP-2.

Таким образом, качественные и количественные результаты настоящего патоморфологического исследования в совокупности с данными анализа иммунофенотипических особенностей в пирамидном слое гиппокампа при экспериментальном моделировании гипертензивной энцефалопатии и экспериментальном моделировании стеноза сонных артерий у крыс могут послужить основой для поиска, разработки и применения фармакологических веществ, обладающих нейропротективным действием в профилактике, лечении и реабилитации пациентов с цереброваскулярной патологией.

## ВЫВОДЫ

1. Комплексное морфологическое исследование с применением программной компьютерной морфометрической оценки и иммуногистохимического метода выявило особенности цитоархитектоники пирамидного слоя гиппокампа крыс в условиях моделируемой гипертензивной энцефалопатии и моделируемого стеноза сонных артерий, что выражается в межполушарной асимметрии повреждения в обеих экспериментальных группах, при этом более выраженный характер повреждения наблюдается в гиппокампе правого полушария. У крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией в СА3 пирамидного слоя гиппокампа правого полушария удельное количество нейронов с признаками повреждения увеличилось наиболее значительно - на 80,4% ( $p < 0,01$ ); у крыс с моделируемым стенозом сонных артерий наиболее выраженное увеличение удельного количества нейронов с признаками повреждения на 23% ( $p < 0,001$ ) обнаружено в СА1 пирамидного слоя правого гиппокампа.

2. У крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией резкое увеличение удельного количества пирамидных нейронов с признаками повреждения на фоне выраженного перицеллюлярного и периваскулярного отека сопровождается активацией процессов каспаза-независимого апоптоза с увеличением экспрессии AIF в СА1 на 2,7 % ( $p < 0,01$ ), в СА2 на 2,5 % ( $p < 0,05$ ) и на 2,9% ( $p < 0,05$ ) в СА4 пирамидного слоя гиппокампа при отсутствии экспрессии каспазы-3 во всех зонах, что свидетельствует о большей роли каспаза-независимого механизма в клеточной гибели. У крыс с моделируемым стенозом сонных артерий на фоне менее выраженного перицеллюлярного и периваскулярного отека обнаружено увеличение экспрессии AIF в СА1 на 3,1% ( $p < 0,001$ ) и на 2,8% ( $p < 0,001$ ) в СА3 пирамидного слоя гиппокампа, что сопровождается увеличением экспрессии проапоптозного белка bax на 0,7 % ( $p < 0,001$ ) в СА1.

3. У крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией в СА1 пирамидного слоя гиппокампа выявлено увеличение экспрессии сериновой рацемазы на 5,5% ( $p < 0,05$ ) и сопровождается транслокацией иммунореактивного материала в дендриты пирамидных нейронов, располагающиеся в радиальном слое, что свидетельствует о нарушенном метаболизме глиотрансмиттера D-серина, дисфункции NMDA-опосредованной нейротрансмиссии и избыточном действии глутамата с развитием эксайтотоксического повреждения. У крыс с моделируемым стенозом сонных артерий наиболее значительное увеличение экспрессии сериновой рацемазы на 6,4 % ( $p < 0,05$ ) выявлено в СА1 пирамидного слоя гиппокампа, что служит дополнительным фактором отсроченного повреждения нейронов в условиях ишемии, утяжеляя функциональные нарушения и когнитивные расстройства.

4. У крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией обнаружено достоверное увеличение экспрессии iNOS во всех зонах гиппокампа, при этом наиболее значительное увеличение на 8,3 % ( $p < 0,001$ ) наблюдается в СА3 пирамидного слоя гиппокампа, что способствует развитию обратимого и необратимого повреждения. У крыс с моделируемым стенозом сонных артерий обнаружено наиболее выраженное увеличение экспрессии iNOS в пирамидном слое гиппокампа в СА1 на 7,4 % ( $p < 0,001$ ) и в СА2 на 8,5 % ( $p < 0,01$ ), резкое увеличение интенсивности экспрессии в сочетании с отсутствием изменения уровня экспрессии nNOS и eNOS свидетельствует о нарушении продукции NO с переключением конститутивного типа на индуцибельный, образовании пероксинитритов, что способствует потенцированию NMDA-зависимой глутаматной цитотоксичности.

5. Морфологические признаки активации компенсаторно-приспособительных процессов наиболее ярко выражены в СА2 и СА4 пирамидного слоя гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией и в пирамидном слое СА2, СА3 и СА4 гиппокампа крыс с моделируемым

стенозом сонных артерий. В группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией в СА2 пирамидного слоя гиппокампа экспрессия GFAP усилилась на 8,9% ( $p < 0,001$ ), а в СА4 на 6,9 % ( $p < 0,001$ ). В группе крыс с моделируемым стенозом сонных артерий в СА2 пирамидного слоя гиппокампа экспрессия GFAP усилилась на 6,3 % ( $p < 0,01$ ), в СА3 на 6,6 % ( $p < 0,001$ ) и в СА4 на 4,1 % по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ). Адаптивные изменения в СА2 и СА4 гиппокампа крыс из группы моделируемой гипертензивной энцефалопатии сопровождались достоверным снижением относительной площади перикарионов нейронов и смещением GFAP-позитивных астроцитов из радиального и краевого в пирамидный слой. СА2, СА3 и СА4 гиппокампа крыс из группы моделируемого стеноза сонных артерий характеризуются приобретением астроглией провоспалительного фенотипа, усиленным ветвлением отростков, реактивной активацией и диффузным астроглиозом с усилением экспрессии GFAP.

6. В условиях моделируемой гипертензивной энцефалопатии в гиппокампе крыс отмечается активация механизмов аутофагии, что подтверждается увеличением экспрессии beclin 1 на 0,6 % ( $p < 0,05$ ) и LAMP-2 на 1,3% ( $p < 0,01$ ) в нейронах пирамидного слоя СА2 в сочетании с активацией нейропротективных процессов, характеризующихся увеличением экспрессии белков теплового шока Hsp70 во всех зонах гиппокампа, при этом в СА1 экспрессия Hsp70 и Hsp90 увеличивалась совместно на фоне возрастания уровня экспрессии bcl-2 в пирамидных нейронах всех зон, которое было наиболее выражено в СА4 (на 5,7%,  $p < 0,01$ ).

7. Обнаруженное при моделировании стеноза сонных артерий у крыс повышение экспрессии beclin 1 на 1,1% ( $p < 0,001$ ) и LAMP-2 на 0,8% ( $p < 0,05$ ) в нейронах пирамидного слоя СА1 гиппокампа свидетельствует об активации механизмов аутофагии, которые могут способствовать реализации нейропротективных процессов, что подтверждается увеличением экспрессии



bc1-2 в СА3 и СА4 пирамидного слоя гиппокампа на 3,4% ( $p < 0,01$ ) и 3,1% ( $p < 0,01$ ) соответственно.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Результаты патологоанатомического исследования, в том числе иммунофенотипических изменений в различных отделах гиппокампа крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии и стеноза сонных артерий могут быть в значительной степени экстраполированы на человеческий организм и после проведения соответствующих исследований внедрены в патологоанатомическую работу для дифференциальной диагностики состояний, связанных с острой и хронической ишемией головного мозга.

Полученные данные о патоморфологических изменениях в гиппокампе при моделировании цереброваскулярной болезни, включая активацию механизмов клеточной гибели и аутофагии, нейропротективных процессов, можно использовать для преподавания патологической анатомии в высших медицинских учебных заведениях.

Результаты морфологического исследования гиппокампа могут быть использованы при проведении научно-исследовательских работ по изучению механизмов влияния ишемии головного мозга на процессы нейронального повреждения, репаративных возможностей и аутофагии, а также при разработке фармакологических препаратов направленного действия при состояниях, связанных с острой и хронической ишемией головного мозга.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Перспективой дальнейшей разработки темы проведенного диссертационного исследования является продолжение изучения признаков и механизмов нейронального повреждения, запрограммированной клеточной гибели, аутофагии, а также процессов регенерации и адаптации в структурах гиппокампа при цереброваскулярной болезни. Результаты проведенного исследования могут быть использованы для дальнейшего поиска оптимальных методов патологоанатомической диагностики и эффективных способов коррекции состояний, связанных с ишемией головного мозга. Перспективой развития темы проведенного исследования является также изучение механизмов синаптической пластичности и нейрогенеза в структурах гиппокампа и зубчатой извилины у человека и млекопитающих.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НМК – нарушение мозгового кровообращения

ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии

СМА – средняя мозговая артерия

СР – сериновая рацемаза

ЦВБ – цереброваскулярные болезни

АIF – апоптоз индуцирующий фактор

AMPA – рецептор аминокислоты 3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой

Araf-1 – фактор активации апоптотической протеазы

Bak – проапоптотический белок из суперсемейства Bcl-2

Bax - проапоптотический белок из суперсемейства Bcl-2

Bcl-2 – антиапоптотический белок

Becn-1 – белок регулятор аутофагии и клеточной гибели, BНЗ-протеин из суперсемейства Bcl-2

CA1 - область I аммонова рога (regio I cornus ammonis)

CA2 - область II аммонова рога (regio II cornus ammonis)

CA3 - область III аммонова рога (regio III cornus ammonis)

CA4 - область IV аммонова рога (regio IV cornus ammonis)

eNOS – эндотелиальная нитрооксидсинтаза

ET-1 – эндотелин-1

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

HIF-1 - индуцируемый гипоксией фактор-1

Hsp70 – белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа

Hsp90 – белок теплового шока с молекулярной массой 90 кДа

iNOS – индуцибельная нитрооксидсинтаза

LAMP-2 – ассоциированный с лизосомами мембранный протеин

LC3-II – маркер аутофагосом

NMDA - N-метил-d-аспартат

NMDAR – рецептор N-метил-d-аспартата

nNOS – нейрональная нитрооксидсинтаза

PARP – поли (АДФ-рибоза) полимеразы

PI – пропидия иодид

SHR – линия спонтанно гипертензивных крыс

SP-SHR – линия спонтанно гипертензивных крыс, склонных к инсульту

STAIR – академические рекомендации к доклиническим исследованиям острого инсульта

TOAST – классификация патогенетических вариантов инсульта

TUNEL – метод исследования апоптоза при помощи проточной цитофлюориметрии

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Авдеев, Д. Б. Плейотропные ферменты апоптоза и синаптическая пластичность гиппокампа белых крыс после окклюзии общих сонных артерий [Текст] / Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин, А. С. Степанов, А. В. Горбунова, С. С. Степанов // Сибирский медицинский журнал. – 2018. – Т. 33, № 3. – С. 102–110.
2. Автандилов, Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
3. Антоненко, Л. М. Когнитивные нарушения, головокружение и неустойчивость у пациентов с артериальной гипертензией [Текст] / Л. М. Антоненко, Н. В. Вахнина, Д. О. Громова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2020. – Т. 12, №5. – С. 92-97.
4. Артюхина, Н. И. Межполушарная асимметрия повреждений гиппокампа после двусторонней перевязки общих сонных артерий [Текст] / Н. И. Артюхина, К. Ю. Саркисова // Российский физиологический журнал. – 2004. – Т. 90, №2. – С. 146–156.
5. Бонь, Е. И. Морфофункциональные нарушения в гиппокампе крыс после субтотальной ишемии [Текст] / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 24–29.
6. Бонь, Е. И. Роль эксайтотоксичности в патогенезе повреждений головного мозга при ишемии [Текст] / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 67–72.
7. Бонь, Е. И. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга [Текст] / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 59–71.

8. Бонь, Е. И. Строение и развитие гиппокампа крысы [Текст] / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 16, № 2. – С. 132–137.
9. Вагнер, Н. Е. Связь показателей эндотелиальной функции и гипертонической энцефалопатии у пациентов с вестибулярным синдромом / Н. Е. Вагнер, А. М. Долгов, Е. Н. Денисов, А. Ю. Рябченко // Уральский медицинский журнал. – 2020. – № 7(190). – С. 80-84.
10. Виноградова, О. С. Гиппокамп и память / О. С. Виноградова - М.: Наука, 1975. - 333 с.
11. Воронков, Д. Н. Иммуноцитохимические и морфометрические изменения астроглии в перифокальной зоне моделируемого инфаркта мозга [Текст] / Д. Н. Воронков, О. В. Сальникова, Р. М. Худоерков // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2017. – Т. 11, № 1. – С. 40–45.
12. Гаевый, М. Д. Воспроизведение геморрагического инсульта в эксперименте [Текст] / М. Д. Гаевый, Л. Е. Назарова, Л. М. Гаевая, Ю. А. Огурцов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2008. – №2. – С. 7–8.
13. Гаевый, М. Д. Ишемия головного мозга, вызванная гравитационной перегрузкой [Текст] / М. Д. Гаевый, Л. М. Аджиенко, Л. М. Макарова, А. А. Абдулсалам // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т. 63, № 3. – С. 63–64.
14. Ганнушкина, И. В. Гипертоническая энцефалопатия [Текст] / И. В. Ганнушкина, Н. В. Лебедева – М.: 1987. – 224 с.
15. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц. — М.: «Практика», 1999. — 459 с.
16. Горбунова, А. В. Глиоцитоархитектоника зубчатой фасции и поля СА4 гиппокампа головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий [Текст] / А. В. Горбунова, Д. Б. Авдеев, С. С. Степанов, В. А.

Акулинин, А. С. Степанов, А. Ю. Шоронова, А. А. Самсонов // Общая реаниматология. – 2019. – Т. 15, № 6. – С. 26–37.

17. Горелик, Е. В. Морфологические изменения гиппокампа при церебральном атеросклерозе в сочетании с острым инфарктом миокарда / Е. В. Горелик, А. В. Смирнов, А. И. Краюшкин, Н. В. Григорьева [Текст] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2015. – Т. 53, № 1. – С. 23–26.

18. Гусев, Е. И. Ишемия головного мозга [Текст] / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М.: Медицина. – 2003. 320 с.

19. Гуцол, А. А. Практическая морфометрия органов и тканей [Текст] / А. А. Гуцол, Б. Ю. Кондратьева. – Томск: Изд-во Томского ун-та. – 1988. – 135 с.

20. Жаботинский, Ю. М. Нормальная и патологическая морфология нейрона [Текст] / Ю. М. Жаботинский – Л.: Медицина, 1965. – 328 с.

21. Забродская, Ю. М. Патоморфологические проявления перитуморозного воспаления при опухолях головного мозга [Текст] / Ю. М. Забродская, Т. В. Жукова, А. Ф. Смянович и др. // Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. – 2020. – Т. 10, №3. – С. 392-399.

22. Калинина, Ю. А. Астроциты и их участие в механизмах терапевтического действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга [Текст] / Ю. А. Калинина, Е. Г. Гилерович, Д. Э. Коржевский // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14, № 1. – С. 33–40.

23. Комлева, Ю. К. Регенеративный потенциал головного мозга: популяционный состав и формирование регуляторного микроокружения в нейрогенных нишах [Текст] / Ю. К. Комлева, Н. В. Кувачева, Н. А. Малиновская, Я. В. Горина, О. Л. Лопатина, Е. А. Тепляшина, Е. А. Пожиленкова, А. С. Замай, А. В. Моргун, А. Б. Салмина // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 44–52.



24. Коржевский, Д. Э. Морфологические проявления локальной функциональной активации астроцитов, вызванной кратковременной общей ишемией головного мозга [Текст] / Д. Э. Коржевский, М. В. Ленцман, А. В. Гиляров, В. Б. Косткин, В. А. Отеллин // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2007. – Т. 43, №5. – С. 423–426.
25. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники [Текст] / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
26. Кошман, И. П. Морфофункциональная характеристика гиппокампа белых крыс в остром периоде после тяжелой черепно-мозговой травмы на фоне применения L-лизина эсцината [Текст] / И. П. Кошман, А. Ю. Шоронова, С. С. Степанов и др. // Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н.В. Склифосовского. – 2020. – Т. 9. – № 4. – С. 529-538.
27. Краснов, А. В. Астроцитарные белки головного мозга: структура, функции, клиническое значение [Текст] / А. В. Краснов // Нейронауки и клиническая неврология. – 2012. – №1. – С. 37–42.
28. Кулеш А. А. Клинические проявления и вопросы диагностики хронического цереброваскулярного заболевания (хронической ишемии головного мозга) на ранней (додементной) стадии [Текст] / А. А. Кулеш, А. Ю. Емелин, А. Н. Боголепов и др. // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2021. – Т. 13, №1. – С. 4-12.
29. Литвинов, А. А. Анализ последствий ишемического поражения головного мозга животных, вызванного воздействием центробежного ускорения в кранио-каудальном векторе на фоне однократного введения производных гамма-амино- и гамма-оксимасляной кислот [Текст] / А. А. Литвинов, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова // Вестник Российской Военно–медицинской академии. – 2012. – Т. 40, № 4. – С. 179–183.
30. Литовченко, А. В. Экспрессия маркеров нейровоспаления и апоптоза в височной доле головного мозга у пациентов с фармакорезистентной

эпилепсией [Текст] / А. В. Литовченко, Ю. М. Забродская, Д. А. Ситовская и др. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2021. – Т. 57, №5. – С. 411-419.

31. Макарова, Л. М. Нейропротективное действие препарата «мексидол» при тотальной ишемии мозга (к вопросу о целесообразности применения данного препарата при гравитационных перегрузках) [Текст] / Л. М. Макарова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – № S1. – С. 48–55.

32. Максимова, К. Ю. Морфологические изменения нейронов в гиппокампе крыс при преждевременном старении [Текст] / К. Ю. Максимова, Н. А. Стефанова, С. В. Логвинов // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 56–61.

33. Мартынова, О. В. Морфологические изменения нейронов головного мозга крыс при двух-, четырёхсосудистой моделях ишемического повреждения головного мозга крыс и их коррекция тадалафилом в эксперименте [Текст] / О. В. Мартынова, А. В. Тверской, М. В. Покровский, М. А. Мартынов, И. Ю. Шкилева, Е. В. Шелякина, О. В. Анциферов, Т. С. Мухина // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №6. – С. 56–61.

34. Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) [Текст] // Режим доступа: [http: mkb-10.com](http://mkb-10.com)

35. Меркулов, Г. А. Курс патологогистологической техники [Текст] / Г. А. Меркулов. – Л.: Медгиз, 1969. – 424 с.

36. Новикова, М. Р. Клинические эффекты латерализованного стволово-гиппокампального и стволово-орбитофронтального повреждений мозга крыс [Текст] / М. Р. Новикова, Е. В. Шарова, М. А. Куликов // Материалы 2-й Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии». – М., 2003. – С.205–209.

37. Острова, И. В. Значение иммуногистохимических исследований белков теплового шока семейства HSP70 для изучения постреанимационных изменений мозга [Текст] / И. В. Острова, В. В. Мороз, М. Ш. Аврущенко // *Общая реаниматология*. – 2007. – № 5–6. – С. 91–96.
38. Острова, И. В. Роль мозгового нейротрофического фактора BDNF и его рецептора TrkB в устойчивости нейронов гиппокампа к ишемии-реперфузии (экспериментальное исследование) [Текст] / И. В. Острова, М. Ш. Аврущенко, А. М. Голубев, Н. В. Голубева // *Общая реаниматология*. – 2018. – Т. 14, № 6. – С. 41–50.
39. Отеллин, В. А. Структурная организация астроцитов гиппокампа крысы в постишемический период [Текст] / В. А. Отеллин, Д. Э. Коржевский, И. П. Григорьев, С. А. Поленов, В. Б. Косткин, М. В. Ленцман, М. Балестрино // *Морфология*. – 2004. – Т.125, №2. – С. 19–21.
40. Пизова, Н. В. Хронические цереброваскулярные заболевания: патогенетические механизмы, клинические проявления и подходы к терапии [Текст] / Н. В. Пизова // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. – 2018. – Т. 10, №1. – С.83–89.
41. Пожилова, Е. В. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки [Текст] / Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. – 2015. – Т. 14, № 4. – С. 35–42.
42. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинский данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA [Текст] / О. Ю. Реброва – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
43. Романенко, А. В. Механизмы гипоксически-ишемического повреждения мозга при инсульте, пути коррекции / А. В. Романенко, Э. Ю. Соловьева // *Нервные болезни*. – 2021. – № 1. – С. 18-27.

44. Саркисов, Д. С. Руководство по гистологической технике [Текст] / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. – М.: Медицина. – 1996. – 242 с.
45. Сергеев, А. В. Естественные механизмы защиты головного мозга человека при хронической ишемии [Текст] / А. В. Сергеев, С. С. Степанов, В. А. Акулинин, А. В. Мызык // Общая реаниматология. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 22–32.
46. Смирнов, А. В. Морфологические изменения гиппокампа при экспериментальном моделировании диабетической энцефалопатии [Текст] / А. В. Смирнов, М. В. Шмидт, Н. Г. Паньшин, А. В. Кузнецова // Волгоградский научно–медицинский журнал. – 2016. Т. 50, № 2. – С. 37–39.
47. Смирнов, А В Иммунофенотипические особенности гиппокампа человека с атеросклерозом церебральных артерий с учетом экспрессии индуцибельной NO-синтазы [Текст] / А. В. Смирнов, Е. В. Горелик, А. И. Краюшкин и др. // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 261-262.
48. Смирнов, А. В. Характеристика экспрессии эндотелиальной по-синтазы в зубчатой извилине крыс при моделировании депрессивного состояния и возможность фармакологической коррекции фенибутом [Текст] / А. В. Смирнов, М. Р. Экова, И. Н. Тюренков, Е. В. Волотова // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2021. – № 2(78). – С. 128-131.
49. Степанов, А. С. Клеточные системы восстановления и утилизации поврежденных нейронов головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий [Текст] / А. С. Степанов, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2017. – Т. 103, № 10. – С. 1135–1147.
50. Степанов, А. С. Коммуникация нейронов поля СА3 гиппокампа головного мозга белых крыс после острой ишемии [Текст] / А. С. Степанов, В. А.

Акулинин, С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев, А. В. Горбунова // *Общая реаниматология*. – 2018. – Т. 14, № 5. – С. 38–49.

51. Степанов, А. С. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии [Текст] / А. С. Степанов, В. А. Акулинин, А. В. Мыщик, С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев // *Общая реаниматология*. – 2017. – Т. 13, № 6. – С. 6–17.

52. Суслина, З. А. Нарушения мозгового кровообращения: диагностика, лечение, профилактика [Текст] / З. А. Суслина, Т. А. Гулевская, М. Ю. Максимова, В. А. Моргунов. – М.: Медпресс-информ, 2016 – 536 с.

53. Фадеева, Н. П. Определение белков наружной мембраны митохондрий, взаимодействующих с белком AIF [Текст] / Н. П. Фадеева, Н. В. Антипова, В. О. Шендер, К. С. Ануфриева, Г. А. Степанов, С. Бастола, М. И. Шахпаронов, М. С. Павлюков // *Acta Naturae*. – 2018. – Т. 10, №4. – С. 100–109.

54. Шаповалова, В. В. Структурно-функциональная реорганизация гиппокампа правого и левого полушарий и функциональная межполушарная асимметрия в постреанимационном периоде [Текст] / В. В. Шаповалова, В. В. Семченко // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 169–173.

55. Шахпаронова, Н. В. Хронические сосудистые заболевания головного мозга: алгоритм диагностики и лечения [Текст] / Н. В. Шахпаронова, А. С. Кадыков // *Consilium Medicum*. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 104–109.

56. Штемберг, А. С. Влияние антиортостатической гиподинамии и перегрузки на дискриминантное обучение и обмен моноаминов в структурах мозга мышей [Текст] / А. С. Штемберг, В. С. Кудрин, П. М. Клодт, В. Б. Наркевич, А. С. Базян // *Нейрохимия*. – 2012. – Т. 29, № 4. – С. 318–326.

57. Щербак, Н.С. Новый способ моделирования обратимой глобальной ишемии головного мозга [Текст] / Н. С. Щербак, М. М. Галагудза, А. Н.

Кузьменков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2011. – Т. 152, № 11. – С. 592–595.

58. Aicher, A. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells [Text] / A. Aicher, C. Heeschen, C. Mildner-Rihm, C. Urbich, C. Ihling, K. Technau-Ihling, A. M. Leiber, S. Dimmeler // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9. – P. 1370–1376.

59. Allen, N. J. Cell biology of astrocyte-synapse interactions [Text] / N. J. Allen, C. Eroglu // *Neuron*. – 2017. – Vol. 96, № 3. – P. 697–708.

60. Ansar, S. Characterization of a new model of thromboembolic stroke in C57 black/6J mice [Text] / S. Ansar, E. Chatzikonstantinou, A. Wistuba-Schier, S. Mirau-Weber, M. Fatar, M. G. Hennerici, S. Meairs // *Transl. Stroke. Res.* – 2013. Vol. 5, № 4. – P. 526–533.

61. Arnoult, D. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli [Text] / D. Arnoult, P. Parone, J. C. Martinou, B. Antonsson, J. Estaquier, J. C. Ameisen // *J. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 159, №6. – P. 923–929.

62. Balan, L. Feedback inactivation of D-serine synthesis by NMDA receptor-elicited translocation of serine racemase to the membrane [Text] / L. Balan, V. N. Foltyn, M. Zehl, E. Dumin, E. Dikopoltsev, D. Knoch, Y. Ohno, A. Kihara, O. N. Jensen, I. S. Radzishovsky, H. Wolosker // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2009. – Vol.106, № 18. – P.7589–94.

63. Bandyopadhyay, U. The chaperon-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane [Text] / U. Bandyopadhyay, S. Kaushik, L. Varticovski, A. M. Cuervo // *Mol. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 28. – P. 5747–5763.

64. Beech, J. S. Further characterisation of a thromboembolic model of stroke in the rat [Text] / J. S. Beech, S. C. Williams, C. A. Campbell, P. M. Bath, A. A. Parsons, A. J. Hunter, D. K. Menon // *Brain Res.* – 2016. – Vol. 895. – P. 18–24.

65. Carloni, S. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia–ischemia induced brain injury [Text] / S. Carloni, G. Buonocore, W. Balduini // *Neurobiol. Dis.* – 2008. – Vol. 32. – P. 329–339.
66. Carmichael, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose [Text] / S. T. Carmichael // *Neuro.* - 2005. – Vol. 2. – P. 396-409.
67. Chai W. N. Neat 1 decreases neuronal apoptosis after oxygen and glucose deprivation [Text] / W. N. Chai, Y. F. Wu, Z. M. Wu et al. // *Neural. Regen. Res.* – 2022. – Vol. 17, № 1. – P. 163-169.
68. Chan, S. L. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities [Text] / S. L. Chan, V. C. Yu // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2004. – Vol. 31, № 3. – P. 119–128.
69. Che, H. MicroRNA-27a promotes inefficient lysosomal clearance in the hippocampi of rats following chronic brain hypoperfusion [Text] / H. Che, Y. Yan, X. H. Kang, F. Guo, M. L. Yan, H. L. Liu, X. Hou, T. Liu, D. K. Zong, L. L. Sun, Y. N. Bao, L. H. Sun, B. F. Yang, J. Ai // *Mol. Neurobiol.* – 2017. – Vol. 54, №4. P. 2595–2610.
70. Chen, Y-J. Blood-brain barrier KCa3.1 channels: evidence for a role in brain Na uptake and edema in ischemic stroke [Text] / Y-J. Chen, B. Wallace, N. Yuen, D. Jenkins, H. Wulff, M. O'Donnell // *Stroke.* – 2015. – Vol. 46, № 1. – P. 237–44.
71. Ciu, S. Y. A common neuronal mechanism of hypertension and sleep disturbances in spontaneously hypertensive rats: Role of orexinergic neurons [Electronic resource] / S. Y. Cui, Y. L. Huang, X. Y. Cui, H. L. Zhao, X. Hu, Y. T. Liu, Y. Qin, N. Kurban, Y. H. Zhang // *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* – 2020. – Vol. 100. Режим доступа: [https:// doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.109902](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109902).
72. Corsani, L. Inducible nitric oxide synthase appears and is co-expressed with the neuronal isoform in interneurons of the rat hippocampus after transient ischemia induced by middle cerebral artery occlusion [Text] / L. Corsani, E. Bizzoco, F.

- Pedata, M. Gianfriddo, M. S. Fausone-Pellegrini, M. G. Vannucchi // *Exp. Neurol.* – 2008. – Vol. 211, № 2. – P. 433–40.
73. Coyle J. T. The role of serine racemase in the pathophysiology of brain disorders [Text] / J. T. Coyle, D. T. Balu // *Adv. Pharmacol.* – 2018. Vol. 82. – P. 35-56.
74. D'Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [Text] / M. S. D'Arcy // *Cell. Biol. Int.* – 2019. – Vol. 43, № 6. – P. 582–592.
75. De Pitta, M. Astrocytes: orchestrating synaptic plasticity? [Text] / M. De Pitta, N. Brunel, A. Volterra // *Neuroscience.* – 2016. – Vol. 323. – P. 43-61.
76. Dewson, G. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis [Text] / G. Dewson, R. M. Kluck // *J Cell Sci.* – 2009. – Vol. 122. – P. 2801–2808.
77. Dinda, B. Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: a review [Text] / B. Dinda, M. Dinda, G. Kulsi, A. Chakraborty, S. Dinda // *Eur. J. Med. Chem.* – 2019. – Vol.169. – P. 185–199.
78. Doti, N. Inhibition of the AIF/CypA complex protects against intrinsic death pathways induced by oxidative stress [Electronic resource] / N. Doti , C. Reuther, P. L. Scognamiglio, A. M. Dolga, N. Plesnila, M. Ruvo, C. Culmsee // *Cell. Death Dis.* – 2014. – Vol. 5. Режим доступа: [https:// doi:10.1038/cddis.2013.518](https://doi:10.1038/cddis.2013.518).
79. Edlich, F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns [Text] / F. Edlich // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2018. – Vol. 500, № 1. – P. 26–34.
80. Endo, Y. Danon disease: a phenotypic expression of LAMP-2 deficiency [Text] / Y. Endo, A. Furuta, I. Nishino // *Acta Neuropathol.* – 2019. – Vol. 129, № 3. – P. 391–8.
81. Ernst, A. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain [Text] / A. Ernst, K. Alkass, S. Bernard // *Cell.* – 2014. – Vol. 156. – P. 1072–1083.



82. Eskelinen, E. L. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy [Text] / E. L. Eskelinen, A. L. Illert, Y. Tanaka, G. Schwarzmann, J. Blanz, K. Von Figura, P. Saftig // *Mol. Biol. Cell.* – 2002. – Vol. 13, № 9. – P. 3355–3368.
83. Fernandez-Fernandez, M. R. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis [Text] / M. R. Fernandez-Fernandez, J. M. Valpuesta // *F1000 Faculty Rev.* – 2018. – Vol. 1497. Режим доступа: [https:// doi: 10.12688/f1000research.15528.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.15528.1).
84. Fisher, M. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations [Text] / M. Fisher, G. Feuerstein, D. W. Howells, P. D. Hurn, T. A. Kent, S. I. Savitz, E. H. Lo; STAIR Group // *Stroke.* – 2009. – Vol. 40, № 6. – P. 2244–2250.
85. Fluri, F. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research [Text] / F. Fluri, M. K. Schuhmann, C. Kleinschnitz // *Drug. Des. Devel. Ther.* – 2015. Vol. 9. – P. 3445–54.
86. Forstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function [Text] / U. Forstermann, W. C. Sessa // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33, № 7. – P. 829–37.
87. Fricker, M. Neuronal cell death [Text] / M. Fricker, A. M. Tolkovsky, V. Borutaite, M. Coleman, G. C. Brown // *Physiol. Rev.* – 2018. – Vol. 98, №2. – P. 813–880.
88. Fuxe, K. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia [Text] / K. Fuxe, B. Bjelke, B. Andbjør, H. Grahn, R. Rimondini, L. F. Agnati // *Neuroreport.* – 1997. – Vol. 8, № 11. – P. 2623–2629.
89. Gabriel, B. Neuronal autophagy in cerebral ischemia – a potential target for neuroprotective strategies? [Text] / B. Gabriel, A. Kost, D. Kasprowska // *Pharmacol. Rep.* – 2012. – Vol. 64, № 1. – P. 1–15.
90. Galluzzi, L. Molecular definitions of autophagy and related processes [Text] / L. Galluzzi, E. H. Baehrecke, A. Ballabio, P. Boya, J. M. Bravo-San Pedro, F. Cecconi,

A. M. Choi, C. T. Chu, P. Codogno, M. I. Colombo, et al. // *EMBO J.* – 2017. – Vol.36. – P. 1811–1836.

91. Garner, T. P. An autoinhibited dimeric form of BAX regulates the BAX activation pathway [Text] / T. P. Garner, D. E. Reyna, A. Priyadarshi, H. C. Chen, S. Li, Y. Wu, Y. T. Ganesan, V. N. Malashkevich, S. S. Almo, E. H. Cheng // *Mol. Cell.* – 2016. – Vol. 63. – P. 485–497.

92. Genest, O. Hsp90 and Hsp70 chaperones: collaborators in protein remodeling [Text] / O. Genest, S. Wickner, S. M. Doyle // *J. Biol. Chem.* – 2019. – Vol. 294, № 6. – P. 2109–2120.

93. Gennaro, M. Rodent models of developmental ischemic stroke for translational research: strengths and weaknesses [Electronic resource] / M. Gennaro, A. Mattiello, T. Pizzorusso // *Neural Plast.* – 2019. Режим доступа: [https:// doi: 10.1155/2019/5089321](https://doi.org/10.1155/2019/5089321).

94. Ginet, V. Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxiaischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms [Text] / V. Ginet, J. Puyal, P. G. Clarke, A. C. Truttmann // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol. 175. – P. 1962–1967.

95. Giordano, K. R. Intracerebral hemorrhage in the mouse altered sleep-wake patterns and activated microglia [Text] / K. R. Giordano, C. R. Denman, H. K. Dollish, F. Fernandez, J. Lifshitz, M. Akhter, R. K. Rowe // *Exp. Neurol.* – 2020. – Vol. 327. – P. 113242.

96. Gob, E. Blocking of plasma kallikrein ameliorates stroke by reducing thromboinflammation [Text] / E. Gob, S. Reymann, F. Langhauser, M. K. Schuhmann, P. Kraft, I. Thielmann, K. Gobel, M. Brede, G. Homola, L. Solymosi, G. Stoll, C. Geis, S. G. Meuth, B. Nieswandt, C. Kleinschnitz // *Ann. Neurol.* – 2015. – Vol. 77, №5. – P. 784–803.

97. Gotoh, T. Hsp70-DNAJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria [Text] / T.

- Gotoh, K. Terada, S. Oyadomari, M. Mori // *M. Cell. Death. Differ.* – 2004. – Vol. 11. – P. 390–402.
98. Grell, A. S. Contractile responses in spontaneously hypertensive rats after transient middle cerebral artery occlusion / A. S. Grell, M. Mostajeran, L. Edvinsson, S. Ansar // *Pharmacology.* – 2018. – Vol. 101, № 3-4. – P. 120-132.
99. Griffiths, B. B. Postinjury inhibition of miR-181a promotes restoration of hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia in rats [Electronic resource] / B. B. Griffiths, Y. B. Ouyang, L. Xu, X. Sun, R. G. Giffard, C. M. Stary // *eNeuro.* – 2019. – Vol. 6, № 4. Режим доступа: [https:// doi: 10.1523/ENEURO.0002-19.2019](https://doi.org/10.1523/ENEURO.0002-19.2019).
100. Grosse, L. Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis [Text] / L. Grosse, C. A. Wurm, C. Bruser, D. Neumann, D. C. Jans, S. Jakobs // *EMBO J.* – 2016. – Vol. 35, № 4. – P. 402–13.
101. Gutierrez-Vargas J. A. Neurodegeneration and convergent factors contributing to the deterioration of the cytoskeleton in Alzheimers disease, cerebral ischemia and multiple sclerosis (review) [Text] / J. A. Gutierrez-Vargas, J. F. Castro-Alvarez, J. F. Zapata-Berruecos et al. // *Biomed Rep.* – 2022. – Vol. 16, № 4. – P. 27.
102. Hashiguchi, A. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase via phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus [Text] / A. Hashiguchi, S. Yano, M. Morioka, J. Hamada, J. Ushio, Y. Takeuchi, K. Fukunaga // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2004. – Vol. 24, № 3. – P. 271–9.
103. Herisson, F. Posterior reversible encephalopathy syndrome in stroke-prone spontaneously hypertensive rats on high-salt diet / F. Herisson, I. Zhou, J. Mawet, E. Du, A. H. Barfejani, T. Qin, M. J. Cipolla, P. Z. Sun, N. S. Rost, C. Ayata // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2019. – Vol. 39, № 7. – P. 1232–1246.

104. Hol, E. M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system [Text] / E. M. Hol, M. Pekny // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2015. – Vol. 32. – P. 121–30.
105. Hossmann, K-A. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes [Text] / K-A. Hossmann // *Neuropharmacology*. – 2008. – Vol. 55, № 3. – P. 257–270.
106. Hou, K. The progress of neuronal autophagy in cerebral ischemia stroke: mechanisms, roles and research methods [Text] / K. Hou, D. Xu, F. Li, S. Chen, Y. Li // *J. Neurol. Sci.* – 2019. – Vol. 400. – P. 72–82.
107. Howells, D. W. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia [Text] / D. W. Howells, M. J. Porritt, S. S. Rewell, V. O'Collins, E. S. Sena, H. B. van der Worp, R. J. Traystman, M. R. Macleod // *J. Cereb. Blood. Flow Metab.* – 2010. – Vol. 30, № 8. – P. 1412–31.
108. Huang, Y. Increased HO-1 expression and decreased iNOS expression in the hippocampus from adult spontaneously hypertensive rats [Text] / Y. Huang, L. Wu, C. Xu, B. Yang, R. Wang // *Cell. Biochem. Biophys.* – 2006. – Vol. 46, № 1. – P. 35–42.
109. Hughes, P. M. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1 [Text] / P. M. Hughes, D. C. Anthony, M. Ruddin, M. S. Botham, E. L. Rankine, M. Sablone, D. Baumann, A. K. Mir, V. H. Perry // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2003. – Vol. 62, № 12. – P. 1276–86.
110. Jin, X. Spatiotemporal profile and morphological changes of NG2 glia in the CA1 region of the rat hippocampus after transient forebrain ischemia [Text] / X. Jin, T-R. Riew, S Kim, H. L. Kim, M-Y. Lee // *Exp. Neurobiol.* – 2020. – Vol. 29, № 1. – P. 50–69.
111. Kang, R. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [Text] / R. Kang, H. J. Zeh, M. T. Lotze, D. Tang // *Cell. Death Differ.* – 2011. – Vol. 18, № 4. – P. 571–580.

112. Katusic, Z. S. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind [Text] / Z. S. Katusic, S. A. Austin // *Eur. Heart. J.* – 2014. – Vol. 35, № 14. – P. 888–94.
113. Kim, K. The effect of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in a collagenase-Induced intracerebral hemorrhage rat model [Text] / K. Kim, H. W. Park, H. E. Moon, J. W. Kim, S. Bae, J. W. Chang, W. Oh, Y. S. Yang, S. H. Paek // *Exp. Neurobiol.* – 2015. – Vol. 24, № 2. – P. 146–155.
114. Kirton, A. Predicting developmental plasticity after perinatal stroke [Text] / A. Kirton // *Dev. Med. Child Neurol.* – 2013. – Vol. 55, № 8. – P. 681–2.
115. Klebe, D. Intracerebral hemorrhage in mice [Text] / D. Klebe, L. Iniaqhe, S. Burchell, C. Reis, O. Akyol, J. Tang, J. H. Zhang // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 1717. – P. 83–91.
116. Kolodney, G. Nuclear compartmentalization of serine racemase regulates D-serine production: implications for N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor activation [Text] / G. Kolodney, E. Dumin, H. Safory, D. Rosenberg, H. Mori, I. Radzishevsky, H. Wolosker // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 52. – P. 31037–50.
117. Krafft, P. R. Modeling intracerebral hemorrhage in mice: injection of autologous blood or bacterial collagenase [Text] / P. R. Krafft, W. B. Rolland, K. Duris, T. Lekic, A. Campbell, J. Tang, J. H. Zhang // *J. Vis. Exp.* – 2012. РЕЖИМ ДОСТУПА: [https:// doi: 10.3791/4289](https://doi.org/10.3791/4289).
118. Kraft, P. FTY720 ameliorates acute ischemic stroke in mice by reducing thrombo-inflammation but not by direct neuroprotection [Text] / P. Kraft, E. Gob, M. K. Schuhmann, K. Gobel, C. Deppermann, I. Thielmann, A. M. Herrmann, K. Lorenz, M. Brede, G. Stoll, S. G. Meuth, B. Nieswandt, W. Pfeilschifter, C. Kleinschnitz // *Stroke.* – 2013. – Vol. 44, №11. – P. 3202–10.
119. Kvensakul, M. The Bcl-2 family in host-virus interactions [Text] / M. Kvensakul, S. Caria, M. G. Hinds // *Viruses.* – 2017. – Vol. 8, № 10. – P. 290.

120. Langer, T. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding [Text] / T. Langer, C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M. K. Hayer, F. U. Hartl // *Nature*. – 1992. – Vol. 356, № 6371. – P. 683–689.
121. Liberek, K. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK [Text] / K. Liberek, J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos, M. Zylicz // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1991. – Vol. 88, № 7. – P. 2874–2878.
122. Liedtke, W. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination [Text] / W. Liedtke, W. Edelmann, P. L. Bieri, F. C. Chiu, N. J. Cowan, R. Kucherlapati, C. S. Raine // *Neuron*. – 1996. – Vol. 17, № 4. – P. 607–615.
123. Liu, B. Autophagy activation aggravates neuronal injury in the hippocampus of vascular dementia rats [Text] / B. Liu, J. Tang, J. Zhang, S. Li, M. Yuan, R. Wang // *Neural. Regen. Res*. – 2014. – Vol. 9. – P. 1288-1296.
124. Liu, H. Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury [Text] / H. Liu, J. Li, F. Zhao, H. Wang, Y. Qu, D. Mu // *Rev. Neurosci*. – 2015. – Vol. 26, № 1. – P. 105–17.
125. Liu, H. Inducible nitric oxide synthase and brain hypoxic-ischemic brain damage [Text] / H. Liu, De. Mu // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. – 2014. – Vol. 16, № 9. – P. 962–7.
126. Love, S. Autopsy approach to stroke [Text] / S. Love // *Histopathology*. – 2011. Vol. 58, № 3. – P. 333-51.
127. Luengo, T. M. The Hsp70-Hsp90 chaperone cascade in protein folding [Text] / T. M. Luengo, M. P. Mayer, S. Rudiger // *Trends Cell Biol*. – 2019 – Vol. 29, № 2. – P. 164–177.

128. MacLellan, C. L. Influence of hypothermia on outcome after intracerebral hemorrhage in rats [Text] / C. L. MacLellan, L. M. Davies, M. S. Fingas, F. Colbourne // *Stroke*. – 2006. – Vol. 37. – P. 1266–1270.
129. Manaenko, A. Comparison of different preclinical models of intracerebral hemorrhage [Text] / A. Manaenko, H. Chen, J. H. Zhang, J. Tang // *Acta Neurochir. Suppl.* – 2011. – Vol. 111. – P. 9–14.
130. Marnane, M. Stroke subtype classification to mechanism-specific and undetermined categories by TOAST, A-S-C-O, and causative classification system: direct comparison in the North Dublin Population Stroke Study [Text] / M. Marnane, C. A. Duggan, O. C. Sheehan, A. Merwick, N. Hannon, D. Curtin, D. Harris, E. B. Williams, G. Horgan, L. Kyne, P. M. McCormack, J. Duggan, A. Moore, G. Crispino-O'Connell, P. J. Kelly // *Stroke*. – 2010. – Vol. 41. – P. 1579–1586.
131. Maurer, L. L. The mechanisms of neurotoxicity and the selective vulnerability of nervous system sites [Text] / L. L. Maurer, M. A. Philbert // *Handb. Clin. Neurol.* – 2015. – Vol. 131. – P. 61–70.
132. Medvedeva, Y. V. Differential vulnerability of CA1 versus CA3 pyramidal neurons after ischemia: possible relationship to sources of Zn<sup>2+</sup> accumulation and its entry into and prolonged effects on mitochondria [Text] / Y. V. Medvedeva, S. G. Ji, H. Z. Yin, J. H. Weiss // *J. Neurosci.* – 2017. – Vol. 37, № 3. – P. 726–737.
133. Meloni, B. P. Characterisation of neuronal cell death in acute and delayed in vitro ischemia (oxygen-glucose deprivation) models [Text] / B. P. Meloni, A. J. Meade, D. Kitikomolsuk, N. W. Knuckey // *J. Neurosci. Methods.* – 2011. – Vol. 195. – P. 67–74.
134. Miller, J. B. New developments in hypertensive encephalopathy [Text] / J. B. Miller, K. Suchdev, N. Jayaprakash, D. Hrabec, A. Sood, S. Sharma, P. D. Levy // *Curr. Hypertens. Rep.* – 2018. – Vol. 20, № 2. – P. 13.
135. Mizushima, N. Autophagy: process and function [Text] / N. Mizushima // *Genes*. – 2007. – Vol. 21. – P. 2861–2873.

136. Mo, Y. Autophagy and inflammation in ischemic stroke [Text] / Y. Mo, Y. Y. Sun, K. Y. Liu // *Neural. Regen. Res.* – 2020. – Vol. 15, № 8. – P. 1388–1396.
137. Moorthi, P. Pathological changes in hippocampal neuronal circuits underlie age-associated neurodegeneration and memory loss: positive clue toward SAD [Text] / P. Moorthi, P. Premkumar, R. Priyanka, K. S. Jayachandran, M. Anusuyadevi // *Neuroscience.* – 2015. – Vol. 301. – P. 90–105.
138. Mukhopadhyay, S. Autophagy and apoptosis: where do they meet? [Text] / S. Mukhopadhyay, P. K. Panda, N. Sinha, D. N. Das, S. K. Bhutia // *Apoptosis.* – 2014. – Vol. 19, № 4. – P. 555–566.
139. Muller, G. J. Ischemia leads to apoptosis-and necrosis-like neuron death in the ischemic rat hippocampus [Text] / G. J. Muller, C. Stadelmann, L. Bastholm, F. Elling, H. Lassmann, F. F. Johansen // *Brain Pathol.* – 2004. – Vol. 14, № 4. – P. 415–424.
140. Mustafa, A. K. Serine racemase deletion protects against cerebral ischemia and excitotoxicity [Text] / A. K. Mustafa, A. S. Ahmad, E. Zeynalov, S. K. Gazi, G. Sikka, J. T. Ehmsen, R. K. Barrow, J. T. Coyle, S. H. Snyder, S. Dore // *J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 30, № 4. – P. 1413–6.
141. Nikolettou, V. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy [Text] / V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, N. Tavernarakis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1833, № 12. – P. 3448–3459.
142. Nishida, Y. Effects and biological limitations of +Gz acceleration on the autonomic functions-related circulation in rats [Text] / Y. Nishida, S. Maruyama, I. Shouji, T. Kemuriyama, A. Tashiro, H. Ohta, K. Hagiwara, M. Hiruma, H. Yokoe // *J. Physiol. Sci.* – 2016. – Vol. 66, № 6. – P. 447–462.
143. O'Brien, C. E. Beclin 1 regulates neuronal transforming growth factor- $\beta$  signaling by mediating recycling of the type I receptor ALK5 [Electronic resource] / C. E. O'Brien, L. Bonanno, H. Zhang, T. Wyss-Coray // *Molecular*



Neurodegeneration. – 2015. – Vol. 10, № 69. Режим доступа: [https:// doi: 10.1186/s13024-015-0065-0](https://doi.org/10.1186/s13024-015-0065-0).

144. Oberstein, A. Crystal structure of the Bcl-XL-Becn1 peptide complex: Becn1 is a novel BH3-only protein [Text] / A. Oberstein, P. D. Jeffrey, Y. Shi // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 17. – P. 13123-13132.

145. Obrenovitch, T. P. The ischemic penumbra: twenty years on [Text] / T. P. Obrenovitch // *Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev.* – 1995. – Vol. 7. – P. 297–332.

146. Ogawa, Y. The relationship between widespread changes in gravity and cerebral blood flow [Text] / Y. Ogawa, R. Yanagida, K. Ueda, K. Aoki, K-I. Iwasaki // *Environ. Health Prev. Med.* – 2016. – Vol. 21, № 4. – P. 186–92.

147. Pandey, P. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90 [Text] / P. Pandey, A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S. M. Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E. S. Alnemri, D. Kufe, et al. // *EMBO J.* – 2000. – Vol.19. – P. 4310–4322.

148. Parpura, V. Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes [Text] / V. Parpura, R. Zorec // *Brain Res. Rev.* – 2010. – Vol. 63, № 1-2. – P. 83–92.

149. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. [Text] / G. Paxinos, C. Watson – London: Academic Press, 2007. – 448 p.

150. Pena-Blanco, A. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis [Text] / A. Pena-Blanco, A. J. Garcia-Saez // *FEBS J.* – 2018. – Vol. 285, № 3. – P416–431.

151. Penke, B. Heat shock proteins and autophagy pathways in neuroprotection: From Molecular Bases to Pharmacological Interventions [Electronic resource] / B. Penke, F. Bogar, T. Crul, M. Santha, M. E. Toth, L. Vigh // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 1. Режим доступа: <https://doi.org/10.3390/ijms19010325>.

152. Perez, E. J. Enhanced astrocytic D-serine underlies synaptic damage after traumatic brain injury [Text] / E. J. Perez, S. A. Tapanes, Z. B. Loris, D. T. Balu, T.

J. Sick, J. T. Coyle, D. J. Liebl // *J Clin. Invest.* – 2017. – Vol. 127, № 8. – P. 3114–3125.

153. Petito, C. K. Sequential development of reversible and irreversible neuronal damage following cerebral ischemia [Text] / C. K. Petito, W. A. Pulsinelli // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1984. – Vol. 43, № 2. – P. 141–53.

154. Petros, A. M. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins [Text] / A. M. Petros, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1644, № 2-3. – P. 83–94.

155. Rahaman, P. Histology of brain trauma and hypoxia-ischemia [Text] / P. Rahaman, M. R. Del Bigio // *Acad. Forensic Pathol.* – 2018. – Vol. 8, № 3. – 539–554.

156. Rami, A. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death [Text] / A. Rami, A. Langhagen, S. Steiger // *Neurobiol. Dis.* – 2008. – Vol. 29. – P. 132–141.

157. Ranjan, A. Non-canonical cell death induced by p53 [Electronic resource] / A. Ranjan, T. Iwakuma // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. Vol. 17, № 12. Режим доступа: [https:// doi: 10.3390/ijms17122068](https://doi.org/10.3390/ijms17122068).

158. Rapp, J. H. Microemboli composed of cholesterol crystals disrupt the blood–brain barrier and reduce cognition [Text] / J. H. Rapp, X. M. Pan, M. Neumann, M. Hong, K. Hollenbeck, J. Liu // *Stroke.* – 2008. – Vol. 39, № 8. – P. 2354–2361.

159. Rassler, B. The renin-angiotensin system in the development of salt-sensitive hypertension in animal models and humans [Text] / B. Rassler // *Pharmaceuticals* – 2010. – Vol. 3. – P. 940–960.

160. Raz, L. The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia [Text] / L. Raz, J. Knoefel, K. Bhaskar // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2016. – Vol. 36, № 1. – P. 172–86.

161. Ren, H. Selective NLRP3 (Pyrin Domain-Containing Protein 3) inflammasome inhibitor reduces brain injury after intracerebral hemorrhage [Text] / H. Ren, Y.

Kong, Z. Liu, D. Zang, X. Yang, K. Wood, M. Li, Q. Liu // *Stroke*. – 2018. – Vol. 49, № 1. – P. 184–192.

162. Robinson, M. J. Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat [Text] / M. J. Robinson, I. M. Macrae, M. Todd, J. L. Reid, J. McCulloch // *Neurosci. Lett.* – 1990. – Vol. 118, № 2. – P. 269–272.

163. Rosenberg, G. A. Bacterial collagenase disrupts extracellular matrix and opens blood-brain barrier in rat [Text] / G. A. Rosenberg, E. Estrada, R. O. Kelley, M. Kornfeld // *Neurosci. Lett.* – 1993. – Vol. 160, № 1. – P. 117–119.

164. Rosenberg, G. A. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [Text] / G. A. Rosenberg, S. Mun-Bryce, M. Wesley, M. Kornfeld // *Stroke*. – 1990. – Vol. 21. – P. 801–807.

165. Rosenzweig, R. The Hsp70 chaperone network [Text] / R. Rosenzweig, N. B. Nillegoda, M. P. Mayer, B. Bukau // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 20, № 11. – P. 665–680.

166. Rueda, C. B. Glutamate excitotoxicity and Ca<sup>2+</sup>-regulation of respiration: Role of the Ca<sup>2+</sup> activated mitochondrial transporters (CaMCs) [Text] / C. B. Rueda, I. Llorente-Folch, J. Traba, I. Amigo, P. Gonzalez-Sanchez, L. Contreras, I. Juaristi, P. Martinez-Valero, B. Pardo, A. Del Arco, J. Satrustegui // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2016. – Vol. 1857, № 8. – P. 1158–66.

167. Saftig, P. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation [Text] / P. Saftig, W. Beertsen, E. L. Eskelinen // *Autophagy*. – 2008. – Vol. 4, № 4. – P. 510–512.

168. Santyr, B. G. Investigation of hippocampal substructures in focal temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis at 7T [Text] / B. G. Santyr, M. Goubran, J. C. Lau, B. Y. Kwan, F. Salehi, D. H. Lee, S. M. Mirsattari, J. G. Burneo, D. A. Steven, A. G. Parrent, S. de Ribaupierre, R. R. Hammond, T. M. Peters, A. R. Khan // *J. Magn. Reson. Imaging*. – 2017. – Vol. 45, № 5. – P. 1359–1370.

169. Schmidt-Kastner, R. Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia [Text] / R. Schmidt-Kastner // *Neuroscience*. – 2015. Vol. 309. – P. 259–79.
170. Shad, K. F. Peripheral biomarker for vascular disorders [Electronic resource] / K. F. Shad, N. Luqman, A. M. Simpson, S. Lal // *Biomark. Insights*. – 2018. – Vol. 29, № 13. Режим доступа: <https://doi.org/10.1177/1177271918812467>.
171. Sharkey, J. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat [Text] / J. Sharkey, I. M. Ritchie, P. Kelly // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1993. – Vol. 13, № 5. – P. 865–871.
172. Sharp, F. R. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia [Text] / F. R. Sharp, A. Lu, Y. Tang, D. E. Millhorn // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2000. – Vol. 20. – P. 1011–1032.
173. Sofroniew, M. V. Astrocytes: biology and pathology [Text] / M. V. Sofroniew, H. V. Vinters // *Acta Neuropathol.* – 2010. – Vol. 119. – P. 7–35.
174. Steiger-Barraissoul, S. Serum deprivation induced autophagy and predominantly an AIF-dependent apoptosis in hippocampal HT22 neurons [Text] / S. Steiger-Barraissoul, A. Rami // *Apoptosis*. – 2009. – Vol. 14. – P. 1274–1288.
175. Stokum, J. A. Molecular pathophysiology of cerebral edema [Text] / J. A. Stokum, V. Gerzanich, J. M. Simard // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2016. – Vol. 36, № 3. – P. 513–38.
176. Strom, J. O. Method parameters impact on mortality and variability in rat stroke experiments: a meta-analysis [Text] / J. O. Strom, E. Ingberg, A. Theodorsson, E. Theodorsson // *BMC Neurosci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 41.
177. Takahashi S. Metabolic compartmentalization between astroglia and neurons in physiological pathophysiological conditions of the neurovascular unit [Text] / S. Takahashi // *Neuropathology*. – 2020. – Vol. 40, № 2. – P. 121-137.
178. Takamatsu, Y. Treadmill running improves motor function and alters dendritic morphology in the striatum after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in

rats [Text] / Y. Takamatsu, A. Ishida, M. Hamakawa, K. Tamakoshi, G. Jung, K. Ishida // *Brain Res.* – 2010. – Vol. 1355. – P. 165–173.

179. Tan, X. L. Partial eNOS deficiency causes spontaneous thrombotic cerebral infarction, amyloid angiopathy and cognitive impairment [Electronic resource] / X. L. Tan, Y. Q. Xue, T. Ma, X. Wang, J. J. Li, L. Lan, K. U. Malik, M. P. McDonald, A. M. Dopico, F. F. Liao // *Mol. Neurodegener.* – 2015. – Vol. 10, № 24. Режим доступа: [https://doi: 10.1186/s13024-015-0020-0](https://doi.org/10.1186/s13024-015-0020-0).

180. Tayebati, S. K. Neuroinflammatory markers in spontaneously hypertensive rat brain: an immunohistochemical study [Text] / S. K. Tayebati, D. Tomassoni, F. Amenta // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* – 2016. – Vol. 15, № 8. – P. 995–1000.

181. Tchekalarova, J. Strain-dependent effects of sub-chronically infused losartan against kainic acid-induced seizures, oxidative stress, and heat shock protein 72 expression [Text] / J. Tchekalarova, N. Ivanova, D. Pechlivanova, K. Ilieva, M. Atanasova // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2014. – Vol. 34, № 1. – P. 133–42.

182. Tomassoni, D. Increased expression of glial fibrillary acidic protein in the brain of spontaneously hypertensive rats [Text] / D. Tomassoni, R. Avola, M. A. Di Tullio, F. Amenta // *Clinical and experimental hypertension.* – 2004. – Vol. 26, № 4. – P. 335–50.

183. Tran, C. C. Brief exposure to -2 Gz reduces cerebral blood flow velocity during subsequent +2 Gz acceleration [Text] / C. C. Tran, G. Ossard, X. Etienne, A. Serra, M. Berthelot, J. C. Jouanin, C. Y. Guezennec // *J. Gravit. Physiol.* – 2004. – Vol. 11, № 2. – P. 81–2.

184. Ueno, M. Blood-brain barrier damage in vascular dementia [Text] / M. Ueno, Y. Chiba, K. Matsumoto, R. Murakami, R. Fujihara, M. Kawauchi, H. Miyanaka, T. Nakagawa // *Neuropathology.* – 2016. – Vol. 36, № 2. – P. 115–24.

185. Vannucchi, M. G. Expression of neuronal and inducible nitric oxide synthase in neuronal and glial cells after transient occlusion of the middle cerebral artery

[Text] / M. G. Vannucchi, L. Corsani, M. Gianfriddo, F. Pedata, M. S. Fausson-Pellegrini // *Neuroscience*. – 2005. – Vol. 136, № 4. – P. 1015–26.

186. Vosler, P. S. Calcium dysregulation induces apoptosis-inducing factor release: cross-talk between PARP-1- and calpain-signaling pathways [Text] / P. S. Vosler, D. Sun, S. Wang, Y. Gao, D. B. Kintner, A. P. Signore, G. Cao, J. Chen // *Exp. Neurol.* – 2009. – Vol. 218. – P. 213–220.

187. Wada, K. Subarachnoid hemorrhage induces neuronal nitric oxide synthase phosphorylation at Ser1412 in the dentate gyrus of the rat brain [Text] / K. Wada, K. Osuka, Y. Watanabe, N. Usuda, M. Fukasawa, Y. Araki, S. Okamoto, T. Wakabayashi // *Nitric Oxide*. – 2018. – Vol. 81. – P. 67–74.

188. Wang, H. Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death [Text] / H. Wang, S. W. Yu, D. W. Koh, J. Lew, C. Coombs, W. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson, V. L. Dawson // *J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 24. – P. 10963–10973.

189. Wang, Y. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos) [Electronic resource] / Y. Wang, N. S. Kim, J. F. Haince, H. C. Kang, K. K. David, S. A. Andrabi, G. G. Poirier, V. L. Dawson, T. M. Dawson // *Sci Signal*. – 2011. Vol. 4(167). Режим доступа: [https:// doi: 10.1126/scisignal.2000902](https://doi.org/10.1126/scisignal.2000902).

190. Wunderlich, M. T. Release of glial fibrillary acidic protein is related to the neurovascular status in acute ischemic stroke [Text] / M. T. Wunderlich, C. W. Wallesch, M. Goertler // *Eur. J. Neurol.* — 2006. — Vol. 13, № 10. — P. 1118—1123.

191. Xu, H. D. Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy [Text] / H. D. Xu, Zh. Qin // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1206. – P. 109–126.

192. Yakovlev, A. A. Pre-conditioning of brain cells to pathological effects: protease involvement (review) [Text] / A. A. Yakovlev, N. V. Gulyaeva // *Biochemistry*. – 2015. – Vol. 80, № 2. – P. 204–213.

193. Yamaguchi, M. One-stage anterior approach for four-vessel occlusion in rat [Text] / M. Yamaguchi, J. W. Calvert, G. Kusaka, J. H. Zhang // *Stroke*. – 2005. – Vol. 36, № 10. – P. 2212–4.
194. Yanagisawa, M. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels [Text] / M. Yanagisawa, H. Kurihara, S. Kimura, K. Goto, T. Masaki // *J. Hypertens. Suppl.* – 1988. – Vol. 6, № 4. – P. 188–191.
195. Yang, D. Vascular recovery promoted by atorvastatin and simvastatin after experimental intracerebral hemorrhage: magnetic resonance imaging and histological study [Text] / D. Yang, R. A. Knight, Y. Han, K. Karki, J. Zhang, C. Ding, M. Chopp, D. M. Seyfried // *J. Neurosurg.* – 2011. – Vol. 114. – P. 1135–1142.
196. Yemisci, M. Aura and stroke: relationship and what we have learnt from preclinical models / M. Yemisci, K. Eikermann-Haerter [Text] // *J. Headache Pain.* – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 63.
197. Yesil, H. The relation of oxidative stress and apoptosis to histopathologic alterations in the lungs as a result of global cerebral ischemia [Text] / H. Yesil, I. Tuglu // *Biotech. Histochem.* – 2019. – Vol. 94, № 8. – P. 555–568.
198. Yoshimura, T. D-amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases [Text] / T. Yoshimura, M. Goto // *FEBS J.* 2008. – Vol. 275, № 14. – P. 3527–37.
199. Yu, S. W. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor [Text] / Yu S. W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. // *Science*. 2002. – Vol. 297. – P. 259-263.
200. Yue, Z. The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases [Text] / Z. Yue, L. Friedman, M. Komatsu, K. Tanaka // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1793. – P. 1496–1507.

201. Zhang Y. Different changes in pre- and postsynaptic components in the hippocampal CA1 subfield after transient global cerebral ischemia [Text] / Y. Zhang, B. H. Tan, S. Wu et al. // *Brain Struct. Funct.* – 2022. – Vol. 227, № 1. – P. 345-360.
202. Zhao, Y. N. Hypertension-mediated enhancement of JNK activation in association with endoplasmic reticulum stress in rat model hippocampus with cerebral ischemia-reperfusion [Text] / Y. N. Zhao, J. M. Li, C. X. Chen, P. Zhang, S. X. Li // *Genet. Mol. Res.* – 2015. – Vol. 14, № 3. – P. 10980–90.
203. Zhu, C. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia [Text] / C. Zhu, X. Wang, F. Xu, B. A. Bahr, M. Shibata, Y. Uchiyama, H. Hagberg, K. Blomgren // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol. 12. – P. 162–176.