

Глиоцитархитектоника зубчатой фации и поля СА4 гиппокампа головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий

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

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

Glial Cell Architecture Dynamics in Dentate Gyrus and CA4 Area of Wistar Rat Hippocampus Following 20-minute Occlusion of Common Carotid Arteries

Anna V. Gorbunova, Dmitry B. Avdeev, Sergey S. Stepanov, Victor A. Akulinin,
Alexander S. Stepanov, Anastasia Yu. Shoronova, Artem A. Samsonov

Omsk State Medical University, Ministry of Health of Russia,
12 Lenin Str., 644099 Omsk, Russia

Цель: изучение распределения и пространственной организации астроцитов зубчатой фации (ЗФ) и поля СА4 гиппокампа белых крыс в норме и после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА).

Методы исследования. Использовали гистологические (окраска гематоксилином и эозином, по Нисслю), иммуногистохимические (GFAP, MAP-2) и морфометрические методы. На тонких (4 мкм) серийных фронтальных срезах гиппокампа изучали астроциты и нейроны в контроле (ложнооперированные животные, $n=5$), через 6 часов ($n=5$), 1 ($n=5$), 3 ($n=5$), 7 ($n=5$), 14 ($n=5$) и 30 суток ($n=5$) после 20-минутной ООСА. Для получения дополнительной количественной информации о пространственной организации астроцитарных сетей использовали фрактальный анализ (ImageJ 1.52; плагин FracLac 2.5). Статистические гипотезы проверили с помощью непараметрических критериев.

Результаты. Через 30 суток после 20-минутной ООСА отмечали необратимую деструкцию только 5,3 % нейронов СА4 и сохранение общей численной плотности гранулярных клеток ЗФ на контрольном уровне. Уже через 6 часов и 1 сутки после ООСА отмечали гипертрофию и усложнение пространственной организации отростков астроцитов, которые сохранялись на протяжении 30 суток. Астроглиоз сопровождался увеличением относительной площади GFAP-позитивного материала, фрактальной размерности и уменьшением лакунарности астроцитарной сети. Особенно наглядно последнее проявлялось через 1, 14 и 30 суток после ООСА.

Заключение. После 20-минутной ООСА в зубчатой фации и СА4 увеличивалась плотность GFAP-позитивного материала, усложнялась реорганизация фиброархитектоники за счет разветвления отростков астроцитов. При этом общая численная плотность нейронов изменялась незначительно. Все это свидетельствовало о вероятной роли астроцитов при постишемической активации механизмов естественной нейропротекции.

Ключевые слова: острая ишемия; гиппокамп; астроциты; иммуногистохимия; GFAP, MAP-2; фрактальный анализ

Aim. To study the distribution and spatial organization of dentate gyrus (DG) astrocytes and CA4 area of hippocampus of Wistar rats following 20-minute occlusion of common carotid arteries (OCCA) compared to sham-operated control animals.

Material and methods. Histological (Nissl staining with hematoxylin and eosin), immunohistochemical (GFAP, MAP-2) and morphometric methods were used. Astrocytes and neurons in control (sham-operated animals, $n=5$) group, after 6 hours ($n=5$), 1 days ($n=5$), 3 days ($n=5$), 7 days ($n=5$), 14 days ($n=5$) and 30 days ($n=5$) after 20-minute OCCA were studied on thin (4 μ m) serial frontal sections of the hippocampus. Fractal analysis (ImageJ 1.52; fracLac 2.5 plugin) was used to obtain additional quantitative information on the spatial organization of astrocyte networks. Statistical hypotheses were tested using nonparametric criteria.

Results. 30 days after the 20-minute OCCA, only 5.3% of CA4 neurons were irreversibly destroyed and the total numerical density of DG granular cells remained at the control level. Hypertrophy and increased com-

Адресс для корреспонденции:

Дмитрий Борисович Авдеев
E-mail: avdeev86@inbox.ru

Correspondence to:

Dmitry B. Avdeev
E-mail: avdeev86@inbox.ru

plexity of the spatial organization of astrocyte processes were observed 6 hours and 1 day after OCCA and persisted for 30 days. Astrogliosis was accompanied by an increased relative area of GFAP-positive material and fractal dimension and reduced lacunarity of the astrocyte network. The latter was especially evident in 1, 14 and 30 days after the OCCA.

Conclusion. After the 20-minute OCCA, the density of GFAP-positive material increased, the fibroarchitecture reorganized and gained more complexity due to the branching of astrocyte processes. At the same time, the total numerical density of neurons changed only slightly. All this indicated the probable role of astrocytes in post-ischemic activation of natural neuroprotection mechanisms.

Keywords: acute ischemia; hippocampus; astrocytes; immunohistochemistry; GFAP, MAP-2; fractal analysis

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-26-37

Введение

У млекопитающих гиппокампальная формация состоит из двух С-образных взаимодействующих образований — зубчатой извилина/фасции (ЗФ) и полей CA1–CA4 собственно гиппокампа. ЗФ охватывает область хилуса, которая содержит полиморфный клеточный слой CA4 и проксимальную часть пирамидального клеточного слоя CA3. То есть, топографически ЗФ, CA3 и CA4 объединены в едином структурно-функциональном комплексе [1–3].

В настоящее время имеются данные, свидетельствующие о том, что в ЗФ взрослого мозга млекопитающих формируются новые нейроны, которые участвуют в процессах обучения и памяти через интеграцию в ранее существовавшие нейронные сети. Это вызывает повышенный интерес к изучению всех особенностей структурно-функциональной организации ЗФ [4, 5]. Каждая из областей гиппокампа имеет свою уникальную структуру и функцию. Различия касаются морфологии нейронов, синаптической пластичности, нейромедиаторов, способности к нейрогенезу, чувствительности к различным повреждениям (включая и ишемию), а также реакции на фармакологические препараты [6]. Большое внимание уделяется изучению астроцитов и микроглиоцитов гиппокампа млекопитающих в норме и при различных патологических состояниях головного мозга [7–10]. Иммуногистохимическая реакция на GFAP позволяет надежно идентифицировать астроциты в нервной ткани [11].

Установлено, что в ответ на черепно-мозговую травму, ишемию, нейродегенерацию изменяется функция и морфология астроцитов. В зависимости от характера воздействия, реакция астроглии может быть очаговой, диффузной или смешанной, проявляться как атрофия, гипертрофия, реактивный и патологический астроглиоз [7, 10–12]. Однако, структурные изменения, лежащие в основе ремоделирования астроцитов гиппокампа после 20-минутной окклюзии сонных артерий требуют дальнейшего изучения.

Ранее мы показали, что после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА)

Introduction

In mammals, the hippocampal formation consists of two C-shaped interpenetrating formations: the dentate fascia/gyrus (DG) and the CA1–CA4 areas of the hippocampus itself. The dentate gyrus covers the chylus region, which contains the polymorphic cell layer CA4 and the proximal portion of the pyramidal cell layer CA3. Thus, topographically, DG, SA3 and SA4 are united in a single structural and functional complex [1–3].

Currently, there is evidence that new neurons, involved in learning and memory processes through integration into pre-existing neural networks, are formed in the DG of the adult mammalian brain. This attracts increased interest in the study of all the features of the structural and functional organization of DG [4, 5]. Each area of the hippocampus has its own unique structure and function. The differences relate to neuron morphology, synaptic plasticity, neurotransmitters, neurogenesis ability, sensitivity to various injuries (including ischemia), as well as response to pharmacological drugs [6]. Considerable attention is given to studying astrocytes and microglyocytes of the mammalian hippocampus in normal and in various pathological conditions of the brain [7–10]. Immunohistochemical reaction to GFAP allows reliable identification of astrocytes in nervous tissue [11].

Astrocyte function and morphology were found to change in response to traumatic brain injury, ischemia, and neurodegeneration. Depending on the nature of the impact, the reaction of astroglia can be focal, diffuse or mixed, manifested as atrophy, hypertrophy, reactive and pathological astroglia [7, 10–12]. However, the structural changes underlying the remodeling of hippocampal astrocytes after 20-minute carotid artery occlusion require further study.

Previously, we showed that after 20-minute occlusion of the common carotid arteries (OCCA), moderate diffuse-focal pathological, adaptive and reparative changes in neurons and astrocytes developed [13, 14]. Other studies have been focused on the structural and functional features of astrocytes after focal necrotic changes of neurons with marked manifestations of pathological astrogliosis [11].

развивались умеренные диффузно-очаговые патологические, адаптивные и репаративные изменения нейронов и астроцитов [13, 14]. В работах других авторов преимущественно исследовалось структурно-функциональное состояние астроцитов после очаговых некротических изменений нейронов, когда отмечались выраженные проявления патологического астроглиоза [11].

По литературным данным, для оценки астроцитарных сетей можно использовать фрактальный анализ. Этот метод позволяет количественно описать качественные характеристики сложной фрактальной или фракталоподобной структуры (например, нейроны, астроциты) путем расчета фрактальной размерности (ФР) — показателя заполнения пространства фрактальной структурой и лакунарности (Λ) — меры неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой. Поэтому этот метод нашел широкое применение как мера структурной сложности природных объектов, в том числе и нервных клеток [11, 15, 16]. Однако астроцитарная сеть гиппокампа после 20-минутной ООСА в таком аспекте не изучалась. Выбор для исследования зубчатой фасции и поля СА4 обусловлен их топографическим единством, высокой устойчивостью к ишемии и недостаточной изученностью астроцитов данных отделов гиппокампальной формации.

Поэтому целью настоящего исследования было изучение распределения и пространственной организации астроцитов зубчатой фасции и поля СА4 гиппокампа белых крыс в норме и после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Материал и методы

Работу выполнили на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическим комитетом университета (протокол №112 от 26 сентября 2019 года). В качестве экспериментальных животных использовали крыс линии Wistar массой 180–200 гр. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями Международного комитета по работе с лабораторными животными, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

Острую 20-минутную ишемию мозга моделировали путем окклюзии общих сонных артерий (ООСА, 2-сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии) на фоне премедикации (сульфат атропина 0,1 мг/кг, подкожно) и общей анестезии (Zoletil® 100, 10 мг/кг). Выбор данной модели был обусловлен тем, что она, в отличие от других, не сопровождается появлением крупных очагов необратимого повреждения головного мозга крыс [17–19].

Материал для морфологического исследования забирали через 6 часов ($n=5$), 1 ($n=5$), 3 ($n=5$), 7

According to the literature, fractal analysis can be used to evaluate astrocyte networks. This method allows to quantitatively describe the qualitative features of complex fractal or fractal-like structures (e.g., neurons, astrocytes) by calculating the fractal dimension (FD) which is a measure of space-filling fractal structure and lacunarity (Λ) which is a measure of the inhomogeneity of space-filling fractal structure. Therefore, this method has been widely used as a measure of the structural complexity of natural objects, including nerve cells [11, 15, 16]. However, the astrocytic network of the hippocampus after 20-minute OCCA in this aspect has not been studied. The choice for the study of dentate gyrus and CA4 area is due to their topographic unity, high resistance to ischemia and insufficient study of astrocytes of these hippocampal areas.

Therefore, the aim of this study was to explore the distribution and spatial organization of astrocytes of the dentate gyrus and the CA4 area of the hippocampus of albino Wistar rats following 20-minute occlusion of the common carotid arteries compared to sham-operated control animals.

Materials and Methods

The work was performed at the Omsk State Medical University, approved by the Ethical Committee of the University (Protocol No. 112 of September 26, 2019). Wistar rats weighing 180–200 g were used in experimental studies. The studies were carried out in accordance with the recommendations of the International Committee for work with laboratory animals supported by WHO and Directive of the European Parliament No. 2010/63/EU of 22.09.10 on the protection of animals used for scientific purposes.

Acute 20-minute cerebral ischemia was modeled by occlusion of common carotid arteries (OCCA, 2-vascular model of incomplete global ischemia without hypotension) with premedication (atropine sulfate 0.1 mg / kg, subcutaneously) and General anesthesia (Zoletil® 100, 10 mg/kg). This model was chosen because, unlike others, it is not accompanied by the appearance of large foci of irreversible brain damage in rats [17–19].

The material for morphological study was collected 6 hours ($n=5$), 1 ($n=5$), 3 ($n=5$), 7 ($n=5$), 14 ($n=5$) and 30 ($n=5$) days after OCCA. The control group ($n=5$) included sham-operated (without OCCA) animals. The brain was fixed by perfusion of 4% paraformaldehyde solution on 0.1 M phosphate buffer (pH=7.4) through the ascending part of the aortic arch. The blocks were encased in homogenized paraffin (HISTOMIX®) using a carousel-type histological wiring machine «STP 120». Serial frontal slices with a thickness of 4 microns were cut at the distance from -2.40 to -4.36 mm from bregma [1]. The sledge microtome HM 450 (Thermo) with electronic control of the slice thickness was employed to make preparations from each 10-th serial cut (5 per case, 25 per each time point).

For a general histological study, the sections were stained with hematoxylin and eosin according to Nissl. Astrocytes were detected by immunohistochemical reaction to glial fibrillary protein (GFAP), and neurons were

($n=5$), 14 ($n=5$) и 30 ($n=5$) суток после ООСА. Контролем ($n=5$) служили ложнооперированные (без ООСА) животные. Головной мозг фиксировали путем перфузии 4% раствора параформа на 0,1 М фосфатном буфере (рН — 7,4) через восходящую часть дуги аорты. Блоки заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®) с помощью автомата для гистологической проводки карусельного типа «STP 120». Серийные фронтальные срезы толщиной 4 мкм резали на уровне (от -2,40 до -4,36 мм Bregma) [1]. Использовали санный микротом HM 450 (Thermo) с электронным контролем толщины среза. Препараты готовили из каждого 10-го серийного среза (5 — на случай, 25 — на срок).

Для обзорного гистологического исследования срезы окрашивали по Нисслю, гематоксилином и эозином. Астроциты выявляли с помощью иммуногистохимической реакции на глиальный фибриллярный белок (GFAP), а нейроны — ассоциированного с микротрубочками белка (MAP-2). Срезы помещали на полилизинные стекла. Применяли моноклональные мышьяные антитела к GFAP (клон GA5, разведение 1:400), (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания) и поликлональные кроличьи антитела к MAP-2 (ab32454, разведение 1:400) (abcam, США). Для визуализации GFAP и MAP-2 использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). После реакции с первичными антителами срезы последовательно инкубировали с вторичными антителами, затем хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрасивали гематоксилином, заключали в полистирол.

Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4×1,4 μm). Для достижения максимальной контрастности и четкости мелких отростков астроцитов в Photoshop CS проводили коррекцию изображения с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость). Морфометрическое исследование астроцитов проводили на масках 8-битовых черно-белых изображений (объектив ×40) с использованием программы ImageJ 1.52. Фрактальный анализ полученных изображений осуществляли с помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods) [15].

Определяли относительную площадь GFAP- и MAP2-позитивного материала в поле зрения (по 80 полей зрения на каждый срок — с пяти животных), фрактальную размерность (ФР — показатель заполнения пространства фрактальной структурой) и лакунарность (Λ — мера неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой) для нейронов и астроцитов. Чем выше лакунарность, тем больше в поле зрения имелось областей без хромогена. Для количественной оценки популяции нейронов ЗФ и поля CA4 через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после ООСА подсчитывали численную плотность нормохромных нейронов, содержащих ядрышко (как маркер).

Проверку статистических гипотез проводили с помощью χ^2 , Mann–Whitney U -test, Wilcoxon signed-rank test и Kruskal–Wallis test (ANOVA) (StatSoft Statistica 8.0) [20]. В ходе проведения статистического анализа нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$.

identified using microtubule associated protein (MAR-2). The sections were placed on poly-L-lysine glasses. Monoclonal mouse antibodies to GFAP (GA5 clone, 1:400 dilution) (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK) and polyclonal rabbit antibodies to MAP-2 (ab32454, 1:400 dilution) (Abcam, USA) were used. The Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK) was used to visualize GFAP and MAP-2. After reaction with primary antibodies, the sections were successively incubated with secondary antibodies, then with DAB Chromogen (3,3'-diaminobenzidine), stained with hematoxylin, and encased in polystyrene.

The preparations were photographed with a microscope Leica DM 1000 (camera GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4×1,4 μm). For maximal contrast and clarity of small processes of astrocytes, image correction was performed in Photoshop CS using the Camera Raw filter (contrast, white balance, clarity). Morphometric study of astrocytes was done on masks of 8-bit black-and-white images (lens ×40) using the ImageJ 1.52 program. Fractal analysis of the obtained images was carried out using the FracLac 2.5 plugin (Box Counting Sampling Methods) [15].

The relative area of GFAP- and MAP2-positive material in the vision field (80 vision fields for each period, from five animals), fractal dimension (index of space filling with fractal structure) and lacunarity (measure of inhomogeneity of space filling with fractal structure) for neurons and astrocytes were determined. The higher the lacunarity, the more chromogen-free regions were seen per vision field. The numerical density of normochromic neurons containing nucleolus (as a marker) was assessed to quantify the population of DG and CA4 area neurons after 1, 3, 7, 14 and 30 days after OCCA.

Statistical hypotheses were tested using χ^2 , Mann–Whitney U -test, Wilcoxon signed-rank test and Kruskal–Wallis test (ANOVA) (StatSoft Statistica 8.0) [20]. During the statistical analysis, the null hypothesis was rejected at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Normally, the dentate gyrus (DG) is characterized by a very high density of distribution of normochromic neurons (granular cells) (fig. 1, *a*, table 1) and their dendritic processes containing MAP-2 (fig. 1, *b*). In CA4, the density of neurons was significantly less, and their bodies and distances between cells were greater than between granular cells in DG. However, the numerical density of gliocytes and the size of their bodies did not differ (table 1). When stained for MAR-2, the relative area of chromogen in the molecular layer of DG was 42.5 (38.7–44.1)% in the control, and 17.9 (13.4–20.5)% in the polymorphic layer. The relative area of MAR-2 in the molecular layer of CA4 was 38.5 (29.8–46.5)%.

After OCCA, various hyperchromic neurons were detected in DG and CA4 throughout the post-ischemic period (fig. 2, *a*). The maximum content of hyperchromic neurons was observed 3 days after the restoration of blood flow (15.5% in DG, 53.2% in CA4). Non-shrunken neurons prevailed, the proportion of irreversibly altered hyperchromic

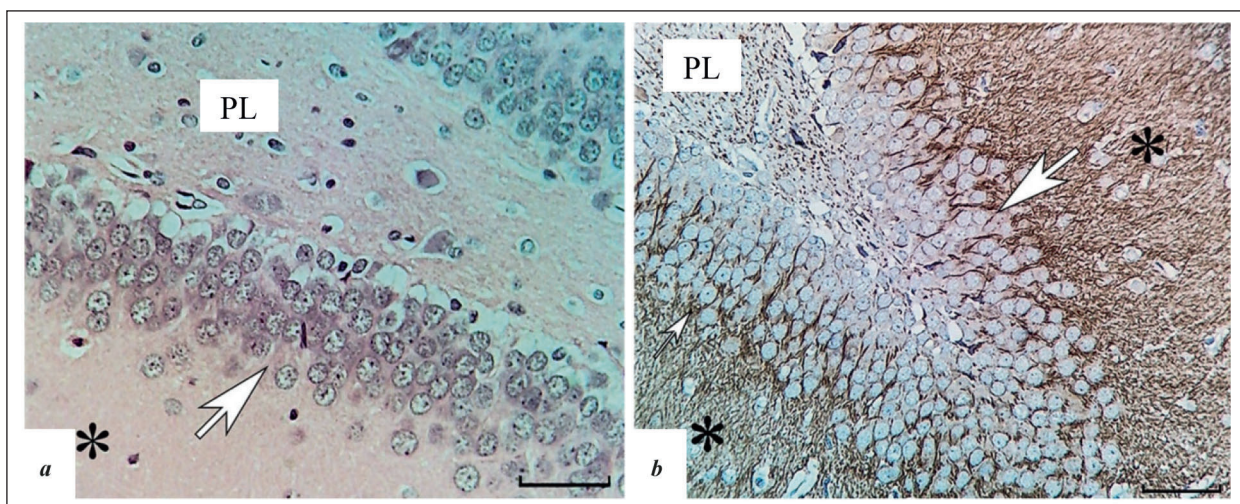


Рис. 1. Зубчатая фасция гиппокампа белых крыс, контроль.

Fig. 1. Dentate gyrus of hippocampus of white rats, control.

Note. *a* — hematoxylin and eosin; *b* — immunohistochemistry, MAP-2. White arrows indicate granular layer; asterisks indicate molecular layer. For fig. 1–3: PL points out the polymorphic layer. Lens $\times 40$; scale 60 microns.

Примечание. *a* — гематоксилин и эозин; *b* — иммуногистохимия, MAP-2. Белые стрелки — гранулярный слой; * — молекулярный слой. Для рис. 1–3: PL — полиморфный слой. Объектив: $\times 40$; шкала — 60 мкм.

Таблица 1. Морфометрическая характеристика нейронов и астроцитов зубчатой фасции и СА4 гиппокампа головного мозга белых крыс в контроле, *Me (QL–QU)*.

Table 1. Morphometric characteristics of neurons and astrocytes of dentate gyrus and CA4 hippocampal field of white rat brain in control group, *Me (QL–QU)*.

Indicators	Area	
	Dentate gyrus	CA4
Total numerical density of neurons, per 1 mm ²	6154 (5550–6408)*	1430 (1256–1495)
Pericaryon area, μm^2	52.8 (48.4–56.5)*	214.3 (178.3–232.8)
Core area, μm^2	40.4 (38.2–41.1)*	116.9 (98.8–133.5)
The distance between the nucleoli of neurons, μm	10.5 (9.9–10.7)*	26.8 (15.3–37.5)
Total numerical density of gliocytes, per 1 mm ² sector	1705.7 (1567.1–1799.8)	1722.2 (1498.5–1812.4)
The body area of an astrocyte, μm^2	39.2 (35.5–40.9)	37.2 (34.3–41.9)
Neuroglial index, units	0.27 (0.26–0.43)*	1.2 (0.8–1.3)

Note. Nissl staining. * — differences in comparison with CA4 are statistically significant at $P < 0.05$ (Wilcoxon criterion for two dependent samples). *Me* — median; *QL* — lower quartile; *QU* — upper quartile.

Примечание. Indicators — показатели; для табл. 1, 2: area — отдел; для табл. 1, 2, 4, 5: dentate gyrus — зубчатая фасция. Total numerical density of neurons, per ... — общая численная плотность нейронов, на ...; pericaryon area — площадь перикариона; core area — площадь ядра; the distance between the nucleoli of neurons — расстояние между ядрышками нейронов; total numerical density of gliocytes, per ... sector — общая численная плотность глиоцитов, на ... сектора; the body area of an astrocyte — площадь тела астроцита; neuroglial index, units — нейроглиальный индекс, от. ед. Окраска по Нислю. * — различия в сравнении с СА4 статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона для двух зависимых выборок). *Me* — медиана; *Q1* — нижний; *Q4* — верхний квантили; ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение (площадь ядра/площадь цитоплазмы).

Результаты и обсуждение

В норме зубчатая фасция (ЗФ) характеризовалась очень высокой плотностью гранулярных клеток (рис. 1, *a*; табл. 1) и их дендритных отростков, содержащих MAP-2 (рис. 1, *b*). В СА4 численная плотность нейронов была значительно меньше, а их тела и расстояния между клетками больше, чем в ЗФ. При этом общая численная плотность глиоцитов и размеры их тел не различались (табл. 1). При окраске на MAP-2 относительная площадь хромогена в молекулярном слое ЗФ составила в контроле 42,5 (38,7–44,1)%, а в полиморфном слое — 17,9 (13,4–20,5)%. Относительная площадь MAP-2 в

shrunken neurons with homogenized nucleus and cytoplasm in this period was about 2–2.5% (DG) and 3–5% (CA4 area). Thus, the proportion of typical normochromic neurons in comparison with control group was significantly reduced. In the CA4 area, statistically significant differences in the proportion of normochromic neurons persisted after 7, 14, and 30 days (table 2).

In the CA4 area after 1, 3, 7 and 14 days after OCCA there were no statistically significant changes in the total numerical density of neurons (TNDN). Only after 30 days, the TNDN deficit was 5.3% (Mann–Whitney *U*-test, $P < 0.05$). In DG, no significant changes in TNDN were detected during

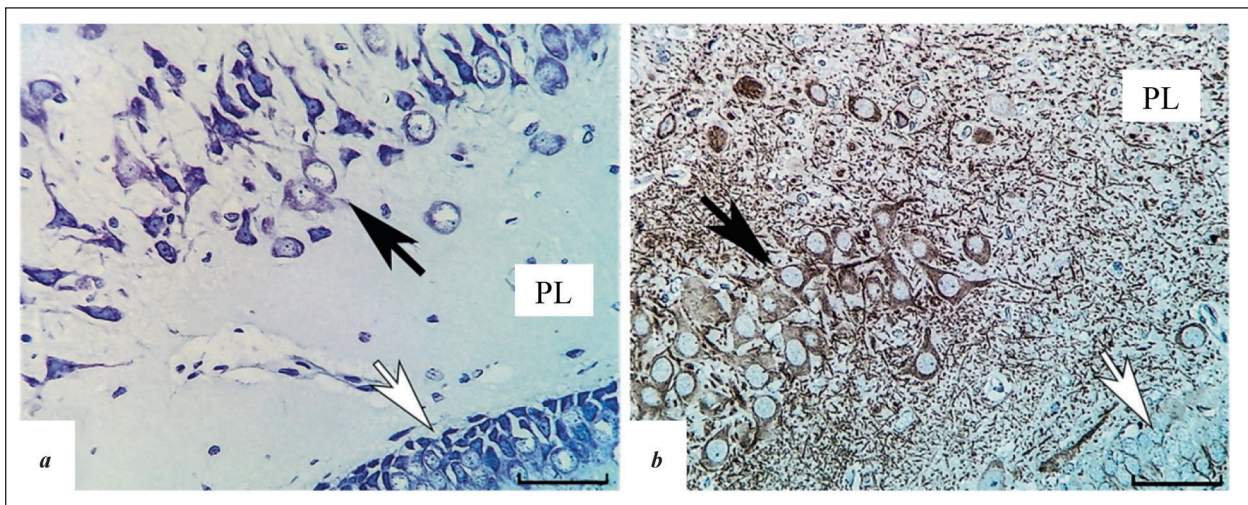


Рис. 2. Поле СА4 и ЗФ гиппокампа белых крыс, 1 суток после ООСА.

Fig. 2. Hippocampal CA4 and DG areas of white rats, 1 day after OCCA.

Note. *a* — normo- and hyperchromic neurons (Nissl staining); *b* — immunohistochemistry (MAP-2). White arrows indicate granular layer, asterisks indicate molecular layer; PL points out the polymorphic layer. Lens $\times 40$, scale 60 microns.

Примечание. *a* — нормо- и гиперхромные нейроны (окраска по Нисслю); *b* — иммуногистохимия (MAP-2). Белые стрелки — гранулярный слой; черные стрелки — нейроны поля СА4. Объектив: $\times 40$, шкала — 60 мкм.

Таблица 2. Содержание нормохромных нейронов в зубчатой фасции и СА4 гиппокампа (на 1 мм² поля зрения) в контроле и после ООСА, Ме (QL–QU).

Table 2. Numerical density of normochromic neurons in the dentate gyrus and CA4 of the hippocampus (per 1 mm² of vision field) in the control group and after OCCA, Me (QL–QU).

Groups	Area	
	Dentate gyrus	CA4
Control	6001 (5420–6204)	1409 (1172–1488)
After OCCA, day		
1	4941 (4745–5102)*	886 (805–1009)*
3	4470 (4234–4555)**	659 (554–755)**
7	5485 (5356–5878)	747 (543–897)*
14	5533 (5235–5902)	1005 (897–1230)**
30	5731 (5672–5876)	1155 (754–1432)*

Note. Me — median; QL — lower quartile; QU — upper quartile. * — differences are statistically significant in comparison with the control; # — comparison with the previous period (Mann–Whitney criteria); differences are statistically significant at $P < 0.05$.

Примечание. Groups — группы; control — контроль; after ..., day — после ..., сутки; Me — медиана; QL — нижний; QU — верхний квартили. * — различия статистически значимы в сравнении с контролем; # — сравнение с предыдущим сроком (критерии Манна–Уитни); различия статистически значимы при $p < 0,05$.

молекулярном слое поля СА4 составила 38,5 (29,8–46,5)%.

После ООСА в ЗФ и СА4 на протяжении всего постишемического периода выявляли различные гиперхромные нейроны (рис. 2, *a*). Максимальное их содержание отмечали через 3 суток после восстановления кровотока (ЗФ 15,5%, СА4 53,2%). Преобладали несморщенные нейроны, а содержание необратимо измененных гиперхромных сморщенных нейронов с гомогенизацией ядра и цитоплазмы в этот срок было на уровне 2–2,5% (ЗФ) и 3–5% (поле СА4). Как следствие, численная плотность типичных нормохромных нейронов в сравнении с контролем статистически значимо снижалась. В поле СА4 значимые различия по содержанию нормохромных нейронов сохранялись через 7, 14 и 30 суток (табл. 2).

the entire follow-up period (3.8%, $P > 0.05$). Thus, after a 20-minute OCCA in the studied parts of the hippocampus, the TNDN remained at a level close to the control.

In immunohistochemical light-optical study of DG in the control group and after OCCA a heterogeneous distribution of GFAP-positive material was revealed: the maximum was seen in the polymorphic layer, the minimum was recorded in the granular layer (fig. 3).

In DG, GFAP-positive material was detected mainly in the bodies and processes of fibrous astrocytes (FA) (fig. 3). These astrocytes had a tree-like structure: a small body (diameter 7–13 microns), long (more often in the molecular and granular layers) or short (more often in the polymorphic layer), smooth weakly branched processes with a very high density of chromogen. The fibrous astrocytes

В поле СА4 через 1, 3, 7 и 14 суток после ООСА общая численная плотность нейронов (ОЧПН на 1 мм² поля зрения) статистически значимо не изменялась. Только через 30 суток дефицит ОЧПН составил 5,3% (Mann–Whitney *U*-test, $p < 0,05$). В ЗФ значимых изменений ОЧПН на протяжении всего периода наблюдения выявлено не было (3,8%, $p > 0,05$). Таким образом, после 20-минутной ООСА в изученных отделах ОЧПН оставалась на близком к контролю уровне.

При иммуногистохимическом светооптическом исследовании ЗФ в контроле и после ООСА выявили неоднородное распределение GFAP-позитивного материала: максимально в полиморфном, минимально — в гранулярном слое (рис. 3).

В ЗФ GFAP-позитивный материал выявляли преимущественно в телах и отростках фиброзных астроцитов (ФА) (рис. 3). Эти астроциты имели древовидную организацию: небольшое тело (диаметр 7–13 мкм), длинные (чаще в молекулярном и гранулярном слоях) или короткие (чаще в полиморфном слое), гладкие слаборазветвленные отростки с очень высокой плотностью хромогена. ФА занимали непрерывающиеся или слегка перекрывающиеся пространственные области (домены), которые были заполнены толстыми и тонкими ветвями отростков. Наиболее крупные ФА с толстыми отростками выявляли в молекулярном слое ЗФ через 14 и 30 суток после ООСА (рис. 3, *e, f*). ФА в гранулярном и молекулярном слоях имели характерные длинные прямые отростки в поперечном направлении. В полиморфном слое преобладали ФА с короткими отростками без преобладающего направления (рис. 3).

Протоплазматические астроциты (ПА) выявляли преимущественно вокруг полиморфных нейронов и в молекулярном слое поля СА4 (рис. 4). Для этих клеток было характерно относительно крупное тело, толстые короткие первичные отростки с неровными контурами, рыхлое заполнение хромогеном и большое количество очень мелких отростков. Мелкие астроцитарные отростки выглядели как хаотический рисунок с невысокой оптической плотностью хромогена (рис. 4, *a*). ПА, как и ФА были связаны с кровеносными сосудами (рис. 4, *b*).

После ООСА увеличивалось количество реактивно измененных астроцитов — и протоплазматических, и фиброзных. Для этих клеток было характерно: высокая очаговая плотность распределения, гипертрофия отростков (утолщение, удлинение) и усложнение фиброархитектоники (рис. 4, 5).

В контроле, по данным классического морфометрического анализа, относительная

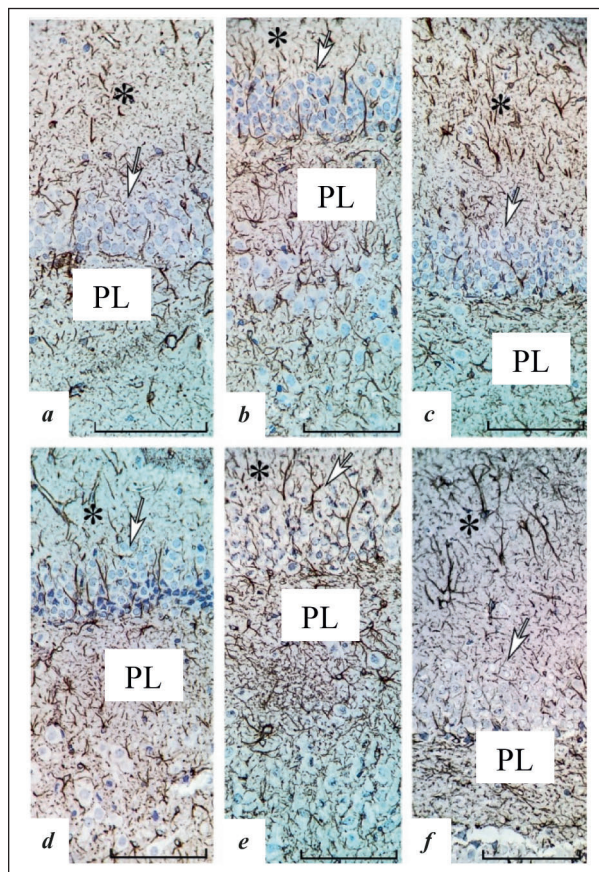


Рис. 3. Фронтальные срезы головного мозга на уровне гиппокампа.

Fig. 3. Frontal sections of brain at the level of hippocampus.

Note. Uneven distribution of chromogen in the layers of the dentate gyrus in the control (*a*), 6 hours (*b*), 1 day (*c*), 3 days (*d*), 14 days (*e*) and 30 days (*f*) after OCCA. White arrows indicate granular layer; asterisks indicate molecular layer. Staining: immunohistochemical reaction to GFAP, hematoxylin post-staining. Lens $\times 40$; scale 100 microns.

Примечание. Неравномерное распределение хромогена в слоях зубчатой фации в контроле (*a*), через 6 часов (*b*), 1 сутки (*c*), 3 суток (*d*), 14 суток (*e*) и 30 суток (*f*) после ООСА. Белые стрелки — гранулярный слой; * — молекулярный слой. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 40$; шкала — 100 мкм.

occupied non-overlapping or slightly overlapping spatial regions (domains), which were filled with thick and thin branches of processes. The largest FA with thick processes were detected in the molecular layer of DG 14 and 30 days after OCCA (fig. 3, *e, f*). The fibrous astrocytes in the granular and molecular layers had characteristic long straight processes in the transverse direction. The polymorphic layer was dominated by FA with short processes without a predominant direction (fig. 3).

Protoplasmic astrocytes (PA) were detected mainly around polymorphic neurons and in the molecular layer of the CA4 area (fig. 4). These cells were characterized by a relatively large body, thick short primary processes with irregular contours, loose filling with chromogen and a large number of very small processes. Small astrocytic processes

площадь частиц хромогена (в единице поля зрения) минимальной была в гранулярном, а максимальной — в полиморфном слое ЗФ (табл. 3). Через 1 сутки после ООСА во всех слоях ЗФ выявляли незначительное (на 5–6%), но статистически значимое увеличение этого показателя. Подобные реактивные изменения длительно сохранялись. Максимальное увеличение площади GFAP (на 10,7% в сравнении с контролем) отмечали через 14 суток после ООСА в полиморфном слое (табл. 3).

Для дополнительной количественной характеристики астроцитов, включающей оценку не только площади, но и формы, распределения их отростков в пространстве использовали фрактальный анализ молекулярного и полиморфного слоев ЗФ. Согласно его результатам, в контроле показатели заполнения пространства фрактальными структурами (иммунореактивные к GFAP отростки и тела астроцитов) в этих слоях статистически значимо различались. В полиморфном слое была больше фрактальная размерность (ФР) (табл. 4) и меньше — лакуарность (табл. 5). Это свидетельствовало о большем заполнении пространства полиморфного слоя отростками астроцитов.

В динамике постишемического периода выявили статистически значимые изменения обеих переменных, характеризующих пространственное распределение GFAP-позитивного материала ЗФ (табл. 4, 5).

Через 1 сутки после ООСА, в сравнении с контролем, в молекулярном и полиморфном слоях ЗФ увеличивалась ФР, а лакуарность — уменьшалась (табл. 4, 5). Через 6 часов, 3, 7, 14

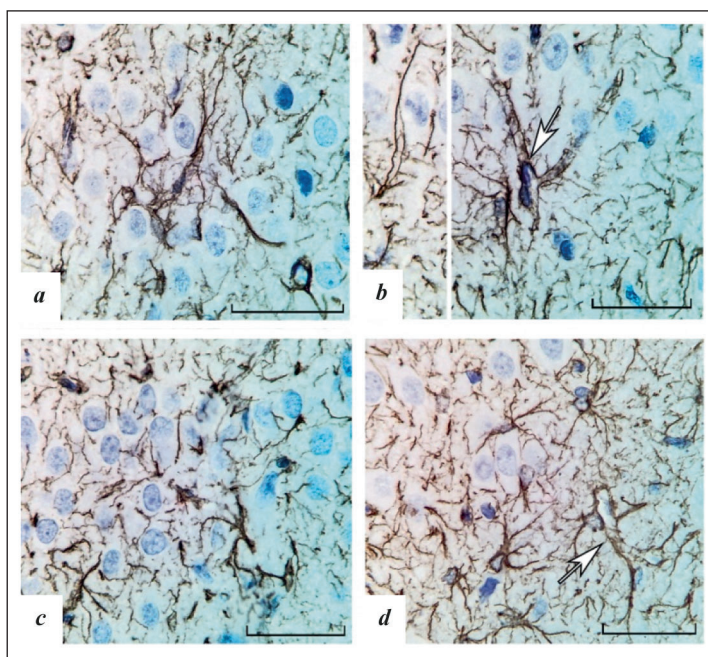


Рис. 4. Протоплазматические астроциты CA4 через 6 часов после ООСА.

Fig. 4. Protoplasmic CA4 astrocytes 6 hours after OCCA.

Note. *a* — large number of small processes on the main stems; *b* — structural connection of astrocyte processes with microvessels; *c, d* — increase in the density of astrocyte distribution between neurons and their domains (*d*). White arrows indicate microvessels. Staining: immunohistochemical reaction to GFAP, hematoxylin post-staining. Lens $\times 100$; scale 25 microns.

Примечание. *a* — большое количество мелких отростков на основных стволах; *b* — структурная связь отростков астроцитов с микрососудом; *c, d* — увеличение плотности распределения астроцитов между нейронами и их домены (*d*). Белые стрелки — микрососуды. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала — 25 мкм.

looked like a chaotic pattern with a low optical density of chromogen (fig. 4, *a*). Protoplasmic astrocytes as well as FA were associated with blood vessels (fig. 4, *b*).

After OCCA, the number of reactive astrocytes, both protoplasmic and fibrous, increased. These

Таблица 3. Относительная площадь (%) частиц хромогена при иммуногистохимическом выявлении (GFAP) элементов глияльной сети зубчатой фасции у животных контрольной и основной группы, Me (Q1–Q4).
Table 3. Relative area (%) of chromogen particles in immunohistochemical detection (GFAP) of glial network elements of dentate gyrus in animals of the control and main groups, Me (Q1–Q4).

Group	Layers dimensions			
	All (total)	Molecular	Granular	Polymorphic
Control	13.2 (10.8–14.2)	10.9 (8.9–13.3)	9.8 (8.9–12.1)	15.8 (13.4–17.3) [#]
After OCCA				
6 hours	13.4 (12.8–15.5)	9.1 (8.4–15.1)	11,3 (10.7–14.2)	15.6 (14.1–18.7) [#]
1	17.8 (16.5–19.9) ^{*#}	17.5 (15.9–20.3) ^{*#}	16,7 (13.8–18.7) ^{*#}	20.4 (18.8–23.2) [*]
3	14.9 (10.5–17.8)	12.0 (10.1–14.6) [#]	15,2 (13.6–17.9) [*]	16.0 (13.7–19.2) [#]
7	14.6 (13.4–17.5)	10,6 (9.1–13.5)	10,3 (9.7–13.4) [#]	20.2 (16.8–23.3) ^{*#}
14	21.3 (19.5–25.3) ^{*#}	16,6 (15.1–19.9) ^{*#}	16,7 (14.8–20.2) ^{*#}	26.3 (22.8–28.5) ^{*#}
30 days	17.3 (14.8–20.5) [*]	16,3 (14.2–18.5) [*]	10.5 (9.1–15.5) [#]	21.7 (18.6–24.5) ^{*#}

Note. * — differences are statistically significant in comparison with the control; [#] — in comparison with the previous period (Mann–Whitney *U*-test); ^{##} — in comparison with the molecular layer (Wilcoxon signed-rank test) at $P < 0.05$.

Примечание. Для табл. 3–5: group — группа; control — контроль; hours — часы; days — дни; layers — слои; after — после; molecular — молекулярный; polymorphic — полиморфный; dimensions — измерения; all (total) — все (суммарно); granular — гранулярный. * — различия статистически значимы в сравнении с контролем; [#] — в сравнении с предыдущим сроком (Mann–Whitney *U*-test); ^{##} — в сравнении с молекулярным слоем (Wilcoxon signed-rank test) при $p < 0,05$.

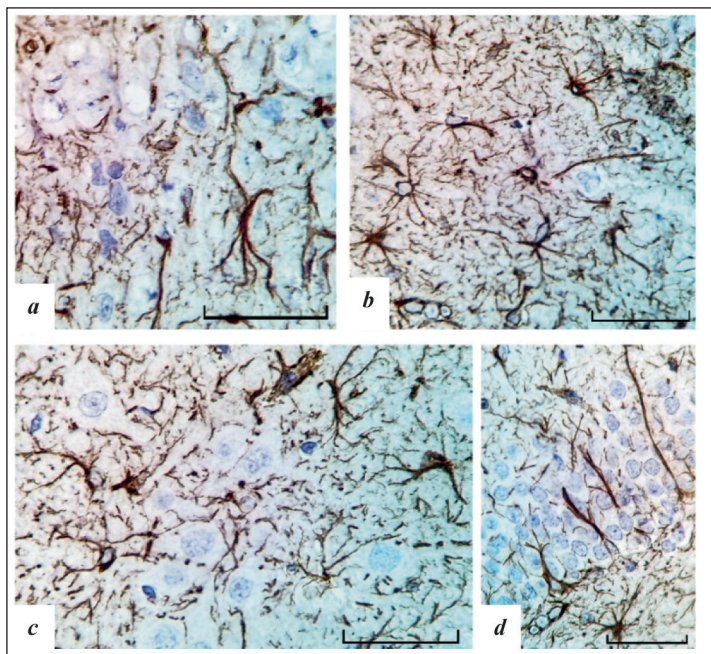


Рис. 5. Фиброзные астроциты зубчатой фассии и СА4 через 1 сутки после ООСА.

Fig. 5. Fibrous astrocytes of dentate gyrus and CA4 1 day after OCCA.

Note. *a* — hypertrophy of astrocyte processes in the molecular layer of dentate gyrus; *b* — increase in the density of astrocyte distribution in the polymorphic layer; *c* — increase in the density of astrocyte distribution within the cell layer of CA4; *d* — hypertrophy of astrocyte processes in the granular layer of dentate gyrus. Staining: immunohistochemical reaction to GFAP, hematoxylin post-staining. Lens $\times 100$; scale 25 microns.

Примечание. *a* — гипертрофия отростков астроцитов в молекулярном слое зубчатой фассии; *b* — увеличение плотности распределения астроцитов в полиморфном слое; *c* — увеличение плотности распределения астроцитов внутри клеточного слоя СА4; *d* — гипертрофия отростков астроцитов в гранулярном слое зубчатой фассии. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала — 25 мкм.

и 30 суток отмечали гетерохронные и гетероморфные изменения ФР и лакуарности в изученных слоях. Кроме того, через 6 часов, 3, 7 и 14 суток в полиморфном слое ФР была выше, а лакуарность ниже, чем в молекулярном слое. Это, вероятно, свидетельствовало о

cells were characterized by high focal density of distribution, hypertrophy of processes (thickening, elongation) and complex fibroarchitecture (fig. 4, 5).

In the control group, according to the classical morphometric analysis, the relative area of chromogen particles (per unit of vision field) was minimal in the granular, and maximal in the polymorphic layer of the DG (table 3). A slight (5–6%), but statistically significant increase in this indicator was found 1 day after OCCA in all layers of DG. Such reactive changes persisted for a long time. The maximum increase in GFAP area (by 10.7% in comparison with the control) was observed 14 days after OCCA in the polymorphic layer (table 3).

For additional qualitative characterization of astrocytes, including their area, shape and spatial distribution of their processes, we used fractal analysis of the molecular and polymorphic layers of DG. According to its results, the control group demonstrated significant differences in the indices of space filling by fractal structures (immunoreactive to GFAP processes and astrocyte bodies) in these layers. The fractal dimension (FD) was more (table 4) and lacunarity was less (table 5) in the polymorphic layer. Data demonstrate an increased filling of the polymorphic layer space by the processes of astrocytes.

During the post-ischemic period, statistically significant changes in both variables characterizing the spatial distribution of GFAP-positive material of the DG were revealed (table 4, 5).

One day after OCCA, FR increased and lacunarity decreased in the molecular and polymorphic layers of DG in comparison with the control (tables 4, 5). After 6 hours, 3, 7, 14 and 30 days, heterochronous and heteromorphic changes in FD and lacunarity were observed in the studied layers. In addition, after

Таблица 4. Фрактальная размерность (ФР) глиальной (GFAP) сети различных слоев зубчатой фассии в контроле и после ООСА, Me (Ql–Qu).

Table 4. Fractal dimension (FD) of the glial (GFAP) network of the various dentate gyrus layers in the control and after OCCA, Me (QL–QU).

Group	Layers of the dentate gyrus	
	Molecular	Polymorphic
Control	1.56 (1.47–1.62)	1.67 (1.59–1.72) ^{##}
After OCCA		
6 hours	1.50 (1.45–1.60)	1.80 (1.67–1.85) ^{*##}
1	1.77 (1.68–1.83) ^{*#}	1.79 (1.69–1.84) [*]
3	1.55 (1.43–1.61) [#]	1.62 (1.49–1.68) ^{##}
7	1.57 (1.51–1.66)	1.73 (1.60–1.79) ^{##}
14	1.67 (1.58–1.73) [*]	1.82 (1.66–1.89) ^{*##}
30 days	1.74 (1.62–1.81) ^{*#}	1.72 (1.65–1.78) [#]

Note. * — differences are statistically significant in comparison with control; # — previous period (Mann–Whitney *U*-test), ## — molecular layer (Wilcoxon signed-rank test) at $P < 0.05$.

Примечание. * — различия статистически значимы в сравнении с контролем; # — предыдущим сроком (Mann–Whitney *U*-test); ## — молекулярным слоем (Wilcoxon signed-rank test) при $p < 0,05$.

Таблица 5. Лакунарность (L) глиальной (GFAP) сети различных слоев зубчатой фасции в контроле и после ООСА, Me (QL-Qu).**Table 5. Lacunarity (L) of the glial (GFAP) network of the various layers of the dentate gyrus in the control and after OCCA, Me (QL-QU).**

Group	Layers of the dentate gyrus	
	Molecular	Polymorphic
Control	0.55 (0.49–0.57)	0.46 (0.41–0.50) ^{##}
After OCCA		
6 hours	0.63 (0.55–0.68) [*]	0.39 (0.35–0.47) ^{*,##}
1	0.39 (0.36–0.47) ^{*,#}	0.35 (0.32–0.42) [*]
3	0.66 (0.60–0.71) ^{*,#}	0.56 (0.50–0.62) ^{*,##}
7	0.76 (0.68–0.79) ^{*,#}	0.35 (0.30–0.48) ^{*,##}
14	0.59 (0.50–0.62) [#]	0.32 (0.29–0.38) ^{*,##}
30 days	0.36 (0.33–0.46) ^{*,#}	0.34 (0.31–0.42) [*]

Note. * — differences are statistically significant in comparison with control; # — previous period (Mann-Whitney *U*-test), ## — molecular layer (Wilcoxon signed-rank test) at $P < 0.05$.

Примечание. * — различия статистически значимы в сравнении с контролем; # — предыдущим сроком (Mann-Whitney *U*-test); ## — молекулярным слоем (Wilcoxon signed-rank test) при $p < 0,05$.

неравномерной реактивной реорганизации астроцитарных отростков в ответ на ишемию и реперфузию — появлении зон с более высокой плотностью и плотным равномерным заполнением пространства за счет разветвления тонких периферических отростков.

Следовательно, фрактальный анализ подтвердил то, что после ООСА в ЗФ происходила гипертрофическая неравномерная пространственная реорганизация реактивных астроцитов (очаговый астроглиоз).

Таким образом, в настоящей работе, с помощью классических методов морфометрии (определение относительной площади GFAP-позитивного материала) и фрактального анализа провели сравнительное исследование астроцитов ЗФ и поля CA4 в контроле и после 20-минутной ООСА. Подобный подход использовался ранее для решения аналогичных задач на других экспериментальных моделях ишемии [7, 11, 12].

Установили, что после ООСА активировались процессы пролиферации и гипертрофии астроцитов. Выявили количественную гетерогенность и гетерохронность изменений пространственной организации астроцитарных отростков в молекулярном и полиморфном слоях ЗФ. Более лабильными и реактивными были мелкие отростки астроцитов. В отдаленном периоде (14 и 30 суток) после ООСА сохранялась повышенная плотность отростков фиброзных астроцитов и общего содержания GFAP-позитивного материала. Максимальные значения характеристик выявили в полиморфном слое. В этот период мера структурной сложности глиальных сетей была существенно выше, а лакунарность ниже, чем в контроле и через 3 и 7 суток постишемического периода. Однако, в нашем исследовании, при отсутствии выраженных очагов некроза и небольшом дефиците нейронов, увеличение количества и площади реактивных фиброзных астроцитов

6 hours, 3, 7 and 14 days, FD was higher and lacunarity was lower in the polymorphic layer than in the molecular layer. This probably indicated an erratic reactive reorganization of astrocytic processes in response to ischemia and reperfusion, i.e. appearance of zones with higher density and dense uniform filling of space due to the branching of thin peripheral processes.

Consequently, fractal analysis confirmed that hypertrophic erratic spatial reorganization of reactive astrocytes (focal astrogliosis) occurred in the DG after OCCA.

Thus, in the present work, using the classical morphometry methods (calculation of the relative area of GFAP-positive material) and fractal analysis, a comparative study of DG and CA4 astrocytes in the control group and after 20-minute OCCA was done. A similar approach was used earlier to solve similar problems in other experimental models of ischemia [7, 11, 12].

Mechanisms of astrocyte hypertrophy were activated after the OCCA. The quantitative heterogeneity and heterochronicity of changes in the spatial organization of astrocytic processes in the molecular and polymorphic layers of DG were revealed. Small processes of astrocytes were more labile and reactive. In the long-term period (14 and 30 days) after OCCA, the increased density of fibrous astrocyte processes and the total content of GFAP-positive material persisted. The maximal values of the mentioned characteristics were revealed in the polymorphic layer. During this period, the structural complexity of glial networks was significantly higher, and lacunarity was lower than in the controls and after 3 and 7 days of the post-ischemic period. However, in our study, with a small neuronal deficit and without severe necrotic foci, the increased number and area of reactive fibrous astrocytes should be considered as evidence of the activation of natural protective functions of the astroglia, aimed at preserving and restoring damaged neurons. Some literature evidence also suggests a protective and restorative role

следует рассматривать как свидетельство активации естественных защитных функций астроглии, направленных на сохранение и восстановление поврежденных нейронов. Некоторые литературные данные также свидетельствуют о защитной и восстановительной роли реактивных астроцитов [7, 11, 12, 21–23]. Все это свидетельствует о перспективности изучения астроглиоза и особенностей нейроглиальных отношений в разных отделах головного мозга после острой ишемии, травмы и при нейродегенеративных заболеваниях [24, 25]

Полученные результаты могут быть использованы для понимания структурных основ естественной нейропротекции за счет активации механизмов реактивного астроглиоза в постишемическом периоде.

Заключение

После 20-минутной ООСА в зубчатой фации и поле CA4 белых крыс увеличивалась плотность GFAP-позитивного материала, усложнялась реорганизация фиброархитектоники за счет разветвления отростков астроцитов. Это происходило на фоне незначительного уменьшения общей численной плотности нейронов. Практическое значение данного исследования заключается в том, что оно подтверждает наличие реактивного астроглиоза при малых повреждениях, целенаправленная регуляция которого позволит, вероятно, влиять на процессы восстановления нейронов после острой ишемии.

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

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Семью авторами лично и в равном количестве применен комплексный методологический подход, включающий экспериментальный, анатомический, гистологический, морфометриче-

ский и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа.

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрено этическим комитетом университета (протокол №112 от 26 сентября 2019 года).

Conclusion

After 20-minute OCCA in the dentate gyrus and CA4 area of white rats, the density of GFAP-positive material increased, complex reorganization of fibroarchitecture occurred due to the branching of astrocyte processes. This was associated with a slight decrease in the total numerical density of neurons. This study confirms the presence of reactive astrogliosis in small lesions. Targeted regulation of astrogliosis will probably affect the neuronal recovery after acute ischemia.

Acknowledgment. This work was supported by the Foundation for Assistance to Innovations within the framework of «UMNIK» program No.14 dated 15.12.2017 and the internal grant of the Omsk State Medical University No. 574 dated 24.11.2017.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest. The work was done at Omsk State Medical University and approved by the Ethics Committee of the University (Protocol No.112 of September 26, 2019).

The authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All the authors participated in the study and used an integrated methodological approach, including experimental, anatomical, histological, morphometric and information-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis.

Литература

1. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
2. Senzai Y. Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system. *Neurosci Res.* 2019 Mar; 140: 43–52. PMID: 30408501 DOI: 10.1016/j.neures.2018.11.003.
3. Fares J, Bou Diab Z, Nabha S, Fares Y. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. *Int J Neurosci.* 2019 Jun; 129 (6): 598–611. PMID: 30433866 DOI: 10.1080/00207454.2018.1545771.
4. Abbott L.C., Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol.* 2019 Sep 30. PMID: 31568602 DOI: 10.1111/ahel.12496.
5. Miller S.M., Sahay A. Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. *Nat Neurosci.* 2019 Oct; 22 (10): 1565–1575. PMID: 31477897 DOI: 10.1038/s41593-019-0484-2.

References

1. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
2. Senzai Y. Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system. *Neurosci Res.* 2019 Mar; 140: 43–52. PMID: 30408501 DOI: 10.1016/j.neures.2018.11.003.
3. Fares J, Bou Diab Z, Nabha S, Fares Y. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. *Int J Neurosci.* 2019 Jun; 129 (6): 598–611. PMID: 30433866 DOI: 10.1080/00207454.2018.1545771.
4. Abbott L.C., Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol.* 2019 Sep 30. PMID: 31568602 DOI: 10.1111/ahel.12496.
5. Miller S.M., Sahay A. Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. *Nat Neurosci.* 2019 Oct; 22 (10): 1565–1575. PMID: 31477897 DOI: 10.1038/s41593-019-0484-2.

6. Alkadhi K.A. Cellular and molecular differences between area ca1 and the dentate gyrus of the hippocampus. *Mol Neurobiol.* 2019 Sep; 56 (9): 6566–6580. PMID: 30874972 DOI: 10.1007/s12035-019-1541-2.
7. Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Front Mol Neurosci.* 2017 Apr 3; 10 (159): 88. PMID: 28420961. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00088.
8. Mohn T.C., Koob A.O. Adult astrogenesis and the etiology of cortical neurodegeneration. *J. Exp. Neurosci.* 2015; 9: 25–34. PMID: 26568684. DOI: 10.4137/JEN.S25520.
9. Rose C. R., Felix L., Zeug A., Dietrich D., Reiner A., Henneberger C. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 10 (451): 1–20. PMID: 29386994. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00451
10. Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A., Brazhe A., Zaitsev A.V., Ruskov D.A., Semyanov A. Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 26; 11: 215. PMID: 29997475. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00215
11. Pirici D., Mogoantă L., Mărgăritescu O., Pirici I., Tudorică V., Coconu M. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2009; 50 (3): 381–390. PMID: 19690763.
12. Ostergaard P.J., Jensen M.B. Histological quantification of astrocytosis after cerebral infarction: A systematic review. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123 (7): 439–443. PMID: 23311713. DOI: 10.3109/00207454.2013.765421.
13. Степанов А.С., Акулинин В.А., Мызык А.В., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии. *Общая реаниматология.* 2017; 13 (6): 6–17. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-6-17
14. Степанов С.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Степанов А.С., Горбунова А.В. Реорганизация астроцитов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2019. Т. 105. № 5. С. 578–590. DOI: 10.1134/S086981391905011X
15. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H.F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7 (3): 1–18. PMID: 23386810. DOI: 10.3389/fncel.2013.00003.
16. Исаева В.В., Пушчина Е.В., Каретин Ю.А. Изменения морфометрических показателей и фрактальной размерности нейронов спинного мозга в онтогенезе симы *Oncorhynchus masou*. *Биология моря.* 2006; 32 (2): 125–133.
17. Lopez M.S., Vemuganti R. Modeling transient focal ischemic stroke in rodents by intraluminal filament method of middle cerebral artery occlusion. *Methods Mol Biol.* 2018; 1717: 101–113. PMID: 29468587 DOI: 10.1007/978-1-4939-7526-6_9.
18. Вавилова В.А., Гуцин Я.А. Моделирование глобальной церебральной ишемии у монгольских песчанок. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2019; 2. DOI: 10.29296/2618723X-2019-02-03
19. Gennaro M, Mattiello A, Pizzorusso T. Rodent models of developmental ischemic stroke for translational research: strengths and weaknesses. *Neural. Plast.* 2019 Apr 4; 2019: 5089321. PMID: 31093271 DOI: 10.1155/2019/5089321.
20. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере.* СПб: Питер; 2003: 688.
21. Escartin C., Guillemaud O., Carrillo-de Sauvage M.A. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia.* 2019 Dec; 67 (12): 2221–2247. PMID: 31429127 DOI: 10.1002/glia.23687.
22. Verkhatsky A., Ho M.S., Vardjan N., Zorec R., Parpura V. General pathophysiology of astroglia. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1175: 149–179. PMID: 31583588 DOI: 10.1007/978-981-13-9913-8_7.
23. Zhou B., Zuo Y.X., Jiang R.T. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2019; 25 (6): 665–673. PMID: 30929313 DOI: 10.1111/cns.13123.
24. Zuidema J.M., Gilbert R.J., Gottipati M.K. Biomaterial approaches to modulate reactive astroglial response. *Cells Tissues Organs.* 2018; 205 (5–6): 372–395. PMID: 30517922 DOI: 10.1159/000494667.
25. Zhou Y.D. Glial Regulation of Energy Metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1090: 105–121. DOI: 10.1007/978-981-13-1286-1_6.
6. Alkadhi K.A. Cellular and molecular differences between area ca1 and the dentate gyrus of the hippocampus. *Mol Neurobiol.* 2019 Sep; 56 (9): 6566–6580. PMID: 30874972 DOI: 10.1007/s12035-019-1541-2.
7. Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Front Mol Neurosci.* 2017 Apr 3; 10 (159): 88. PMID: 28420961. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00088.
8. Mohn T.C., Koob A.O. Adult astrogenesis and the etiology of cortical neurodegeneration. *J. Exp. Neurosci.* 2015; 9: 25–34. PMID: 26568684. DOI: 10.4137/JEN.S25520.
9. Rose C. R., Felix L., Zeug A., Dietrich D., Reiner A., Henneberger C. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 10 (451): 1–20. PMID: 29386994. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00451
10. Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A., Brazhe A., Zaitsev A.V., Ruskov D.A., Semyanov A. Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 26; 11: 215. PMID: 29997475. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00215
11. Pirici D., Mogoantă L., Mărgăritescu O., Pirici I., Tudorică V., Coconu M. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2009; 50 (3): 381–390. PMID: 19690763.
12. Ostergaard P.J., Jensen M.B. Histological quantification of astrocytosis after cerebral infarction: A systematic review. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123 (7): 439–443. PMID: 23311713. DOI: 10.3109/00207454.2013.765421.
13. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Mysik A.V., Stepanov S.S., Avdeev D.B. Neuro-Glio-Vascular Complexes of the Brain After Acute Ischemia. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2017; 13 (6): 6–17. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-6-17
14. Stepanov S.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Stepanov A.S., Gorbunova A.V. Reorganization of astrocyte neocortex of white rats after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2019; 105 (5): 578–590. [In Russ.] DOI: 10.1134/S086981391905011X
15. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H.F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7 (3): 1–18. PMID: 23386810. DOI: 10.3389/fncel.2013.00003.
16. Isaeva V.V., Pushchina E.V., Karetin Yu.A. Changes in morphometric parameters and fractal dimension of spinal cord neurons in the ontogenesis of *Sim Oncorhynchus masou*. *Biologiya morya.* 2006; 32 (2): 125–133. [In Russ.]
17. Lopez M.S., Vemuganti R. Modeling transient focal ischemic stroke in rodents by intraluminal filament method of middle cerebral artery occlusion. *Methods Mol Biol.* 2018; 1717: 101–113. PMID: 29468587 DOI: 10.1007/978-1-4939-7526-6_9.
18. Vavilova V.A., Gushchin Ya.A. Modeling global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy.* 2019; 2. [In Russ.] DOI: 10.29296/2618723X-2019-02-03
19. Gennaro M, Mattiello A, Pizzorusso T. Rodent models of developmental ischemic stroke for translational research: strengths and weaknesses. *Neural. Plast.* 2019 Apr 4; 2019: 5089321. PMID: 31093271 DOI: 10.1155/2019/5089321.
20. Bоровиков В. *Statistica. The art of analyzing data on a computer.* St. Petersburg: Peter; 2003: 688. [In Russ.]
21. Escartin C., Guillemaud O., Carrillo-de Sauvage M.A. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia.* 2019 Dec; 67 (12): 2221–2247. PMID: 31429127 DOI: 10.1002/glia.23687.
22. Verkhatsky A., Ho M.S., Vardjan N., Zorec R., Parpura V. General pathophysiology of astroglia. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1175: 149–179. PMID: 31583588 DOI: 10.1007/978-981-13-9913-8_7.
23. Zhou B., Zuo Y.X., Jiang R.T. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2019; 25 (6): 665–673. PMID: 30929313 DOI: 10.1111/cns.13123.
24. Zuidema J.M., Gilbert R.J., Gottipati M.K. Biomaterial approaches to modulate reactive astroglial response. *Cells Tissues Organs.* 2018; 205 (5–6): 372–395. PMID: 30517922 DOI: 10.1159/000494667.
25. Zhou Y.D. Glial Regulation of Energy Metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1090: 105–121. DOI: 10.1007/978-981-13-1286-1_6.

Поступила 04.06.19

Received 04.06.19