

Влияние окклюзии общих сонных артерий на двуядерные клеточные образования сенсомоторной коры большого мозга крыс

Д. Б. Авдеев*, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, А. Ю. Шоронова,
Л. М. Макарьева, А. В. Горбунова, М. С. Коржук, М. В. Маркелова

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

Common Carotid Artery Occlusion and Double-Nucleated Cellular Structures In The Rat Sensorimotor Cerebral Cortex

Dmitry B. Avdeev*, Victor A. Akulinin, Sergei S. Stepanov, Anastasia Yu. Shoronova,
Lyubov M. Makarieva, Anna V. Gorbunova, Mikhail S. Korzhuk, Marina V. Markelov

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

Для цитирования: Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, А. Ю. Шоронова, Л. М. Макарьева, А. В. Горбунова, М. С. Коржук, М. В. Маркелова. Влияние окклюзии общих сонных артерий на двуядерные клеточные образования сенсомоторной коры большого мозга крыс. *Общая реаниматология*. 2021; 17 (2): 55–71. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-2-55-71> [На русск. и англ.]

For citation: Dmitry B. Avdeev, Victor A. Akulinin, Sergei S. Stepanov, Anastasia Yu. Shoronova, Lyubov M. Makarieva, Anna V. Gorbunova, Mikhail S. Korzhuk, Marina V. Markelov. Common carotid artery occlusion and double-nucleated cellular structures in the rat sensorimotor cerebral cortex. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2021; 17 (2): 55–71. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-2-55-71> [In Russ. and Engl.]

Резюме

Цель исследования. Изучить двуядерные клеточные образования сенсомоторной коры (СМК) большого мозга половозрелых белых крыс после 40-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Методы исследования. Острую ишемию моделировали на белых крысах Wistar путем 40-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА). Проводили сравнительную морфометрическую оценку цито-, дендро, синапто- и глиоархитектоники неокортекса в норме ($n=5$), через 1 ($n=5$), 3 ($n=5$) и 7 суток ($n=5$) после ООСА. Использовали окраски по Нисслю, гематоксилином и эозином, иммуногистохимические реакции на NSE, MAP-2, HSP-70, p38, caspase-3, GFAP, AIF1 и Ki-67. Оценивали численную плотность пирамидных нейронов, олигодендроцитов (ОДЦ), микроглиоцитов (МГЦ), содержание дистрофически и некробиотически измененных нейронов, с одним и более ядрышками, гетеро- и дикарионов. Проверку статистических гипотез проводили с помощью программы Statistica 8.0.

Результаты. После ООСА статистически значимо увеличивалось содержание дистрофически и некробиотически измененных нейронов, содержание нейронов с двумя ядрами, с двумя и более ядрышками, общее количество (пролиферация) и содержание гипертрофированных астроцитов, ОДЦ и МГЦ. В течение всего периода наблюдения общая численная плотность нейронов СМК после ООСА в слое III уменьшалась на 26,4% ($p=0,001$), а слой V — на 18,5% (Mann–Whitney U -test; $p=0,01$). Патологические и компенсаторно-восстановительные изменения носили диффузно-очаговый характер и проявлялись более выражено в слое III неокортекса. Содержание двуядерных гетерокарионов и дикарионов через 1-и и 3-е суток после ООСА в сравнении с контролем — 3,5 (1,5–4,0)/мм² — не изменялось, а через 7 суток увеличивалось до 6,5 (5,0–8,5)/мм² (Mann–Whitney U -test; $p=0,002$). Увеличение происходило на фоне более высокого, чем в контроле, содержания ОДЦ и МГЦ. В этот период в слое III и V также отметили максимальное количество нейронов с двумя и более ядрышками.

Заключение. После 40-минутной ООСА в СМК на фоне дистрофических и некробиотических изменений пирамидных нейронов и активации нейроглиальных клеток происходило увеличение образования гетерокарионов и нейронов с амплифицированным ядрышком. Выявленные изменения рассматривали как один из вариантов реакции нейронов на ишемическое повреждение.

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

Конфликт интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Адрес для корреспонденции:

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

Correspondence to:

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

Благодарность. Данная работа выполнена при поддержке Омского государственного медицинского университета в рамках подготовки и аттестации научно-педагогических и научных кадров.

Summary

The aim of the study. To study the double-nucleated cellular structures of the brain sensorimotor cortex (SMC) of sexually mature white rats after a 40-minute occlusion of the common carotid arteries.

Methods. Acute ischemia was simulated in white Wistar rats by 40-minute occlusion of the common carotid arteries (OCCA). We performed comparative morphometric evaluation of cyto-, dendro-, synapto-, and glioar-chitectonics of the neocortex in intact animals ($n=5$), and 1 ($n=5$), 3 ($n=5$), and 7 days ($n=5$) after OCCA. We used Nissl, hematoxylin and eosin staining, and immunohistochemical reactions for NSE, MAP-2, HSP-70, p38, caspase-3, GFAP, AIF1, and Ki-67. Numerical density of pyramidal neurons, oligodendrocytes (ODCs), microglia (MGCs), presence of dystrophic and necrobiotic neurons with one or more nucleoli, hetero- and dikaryons were assessed. Statistical hypotheses were tested using Statistica 8.0 software.

Results. The percentage of dystrophic and necrobiotic neurons, nerve cells with two nuclei or two or more nucleoli, the total number (proliferation) and percentage of hypertrophic astrocytes, ODCs and MGCs increased significantly after OCCA. The total numerical density of SMC neurons decreased by 26.4% ($P=0.001$) in layer III and by 18.5% in layer V (Mann–Whitney U Test; $P=0.01$) after OCCA throughout the observation period. Pathological and compensatory changes were diffusely focal and more pronounced in layer III of the neocortex. The density of bi-nucleated heterokaryons and dikaryons remained unchanged on days 1 and 3 after OCCA vs control and was 3.5 (1.5–4.0)/mm², and increased to 6.5 (5.0–8.5)/mm² on day 7 (Mann–Whitney U Test; $P=0.002$). This increase occurred along with a higher density of ODCs and MGCs than in the control. The maximum number of neurons with two or more nucleoli was also noted in layer III and V during this period.

Conclusion. After 40-minute OCCA in SMC, parallel to the dystrophic and necrobiotic changes of pyramidal neurons and activation of neuroglial cells, there was an increase in the formation of heterokaryons and neurons with amplified nucleolus. These changes were considered as a variant of neuronal response to ischemic damage.

Keywords: acute ischemia, neocortex; bi-nucleated neurons; astroglia; microglia; immunohistochemistry; morphometry; Wistar rats

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This study was supported by the Omsk State Medical University as part of the training and certification program for scientific and teaching staff.

DOI:10.15360/1813-9779-2021-2-55-71

Введение

Известно, что после острой ишемии головного мозга, на фоне обратимых дистрофических, атрофических и некробиотических изменений нейронов, нейроглиальных клеток и клеток микрососудов, активируются компенсаторно-восстановительные механизмы [1, 2]. В совокупности это приводит к пространственной реорганизации межклеточных взаимоотношений нервной ткани. Изменяются не только межнейронные связи, но и морфология нейроглио-микрососудистых комплексов [3–5]. Значительно активируются астроциты, ОДЦ и МГЦ. Кроме гипертрофии, гиперплазии, изменений формы и размеров, отмечается пролиферация этих клеток, усложнение их пространственной организации, усиление механической подвижности периферических отростков и синтеза трофических факторов [6–12]. Высокая подвижность нейроглиальных клеток, их миграция относительно перикарионов приводит, с одной стороны, к увеличению содержания свободных активированных форм, а, с другой стороны — сателлитарных и фагоцитирующих форм клеток, а также к слиянию клеток и, возможно, их перепрограммированию [13–16].

Introduction

After acute cerebral ischemia, amid reversible dystrophic, atrophic and necrobiotic changes of neurons, neuroglial cells and microvascular cells, the compensatory and restorative mechanisms are activated [1, 2]. Taken together, this leads to spatial reorganization of cellular interconnections of neural tissue. Not only interneuronal connections but also the morphology of complexes between neurons, glial cell and microvessels change [3–5]. Astrocytes, ODCs and MGCs become highly activated. In addition to hypertrophy, hyperplasia, shape and size changes, these cells proliferate, their spatial organization becomes more complex, mechanical motility of peripheral processes and production of trophic factors increases [6–12]. The high mobility of neuroglial cells and their migration in relation to perikaryons lead, on the one hand, to an increased level of free activated as well as satellite and phagocytic cells, and also to cell fusion and, probably, their reprogramming [13–16]. An increase in the number of cellular structures, where perikaryons and glial cell bodies significantly converge up to the invagination of smaller cells (gliocytes) into larger ones (neurons) and fusion [13, 14, 17, 18]. The fusion of neurons and glial cells is hypothesized [13,

Отмечается увеличение количества клеточных конструкций, в которых перикарионы и тела глиальных клеток значительно сближаются вплоть до инвагинаций более мелких клеток (глиоциты) в крупные (нейроны) и слияния [13, 14, 17, 18]. Существует гипотеза о слиянии нейронов и глиальных клеток [13, 14, 19]. Особая роль при этом отводится ОДЦ [20]. Слияние ОДЦ с нейронами коры головного мозга, вероятно, может быть частью нормального онтогенеза и возможным средством нейрорегенерации в процессе старения и при гипоксическом/ишемическом воздействии. Авторы предполагают, что после такого слияния ядро ОДЦ подвергается нейроспецифическому перепрограммированию, в результате чего образуются двуядерные нейроны, что удваивает функциональные возможности нейрона [20]. При патологии слиянию ОДЦ и нейронов может способствовать формирование амебоидного фенотипа микроглии, для которого характерны высокая подвижность, преобладание фагоцитарной функции и секреции цитокинов [21]. Кроме того, потеря связей между нейронами и микроглией после ишемии способствует дальнейшей активации последней, что усиливает воспаление, вызванное высвобождением провоспалительных цитокинов. Эти изменения, вероятно, могут быть инициированы перичеллюлярным отеком, который разрывает связи нейронов и микроглии [8].

Реактивно измененные нейроны имеют повышенную способность к слиянию. Имеются морфологические подтверждения принципиальной возможности слияния нейрональных отростков и перикарионов с другими клетками. Сливаются не только тела клеток, но и их отростки, стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов [22, 23]. Такая возможность показана для клеток Пуркинье, мотонейронов спинного мозга и пирамидных нейронов неокортекса. Авторы публикаций обнаруживали в неокортексе гетеро- и дикарионы — нейроны с двумя ядрами, различающимися и одинаковыми по морфологическим и цитохимическим признакам [20, 22–24]. Так, после прерывистой гипобарической гипоксии количество двуядерных нейронов в слоях III–V моторной коры белых крыс увеличивалось на 23,4%. Авторы предполагают, что повышенное содержание двуядерных нейронов может служить структурной основой нейропротекторных эффектов адаптации к гипоксии [19]. К увеличению количества гетерокарионов клеток Пуркинье в неонатальном мозжечке приводит радиационное повреждение [25]. В мозжечке также отмечено образование двуядерных гетерокарионов при рассеянном склерозе [26].

14, 19]. A special role in this process is assigned to ODCs [20]. Fusion of ODCs with cortical neurons can probably be a part of normal ontogenesis and a possible way of neuroregeneration in aging or during hypoxia/ischemia. The authors suggest that after such fusion, the nucleus of ODC undergoes neurospecific reprogramming, which results in the formation of binuclear neurons with double functional capacity [20]. In pathological conditions, fusion of ODCs and neurons can be promoted by amoeboid phenotype of microglia characterized by high motility, predominant phagocytic function and cytokine secretion [21]. Moreover, the loss of connections between neurons and microglia after ischemia contributes to further activation of the latter, which enhances inflammation caused by the release of proinflammatory cytokines. These changes can probably be initiated by pericellular edema, which disrupts connections between neurons and microglia [8].

Neurons with reactive changes have an increased ability to fuse. There is histological evidence of fusion of neuronal processes and perikarions with other cells as well. Not only cell bodies but also their processes can fuse, stimulating proinflammatory cytokine production [22, 23]. This possibility has been shown for Purkinje cells, spinal cord motoneurons, and pyramidal neurons of the neocortex. The researchers detected hetero- and dikaryons (neurons with two nuclei which can be both differing and identical morphologically and cytochemically) in the neocortex [20, 22–24]. Thus, after intermittent hypobaric hypoxia, the number of binuclear neurons in layers III–V of the motor cortex of white rats increased by 23.4%. The authors suggest that the increased content of binuclear neurons may underlie the neuroprotective adaptation to hypoxia [19]. An increase in the number of Purkinje cell heterokaryons in the neonatal cerebellum can be caused by radiation damage [25]. The formation of binucleate heterokaryons in the cerebellum has also been noted in multiple sclerosis [26].

All these processes are closely related to the immune system, which provides tissue homeostasis both under physiological conditions and pathology [27]. Microgliaocytes are considered under this aspect [11, 12]. However, the biological and functional role of microglia in the formation of hetero- and dikaryons has not been studied. Although there are studies demonstrating direct fusion of microglia with pyramidal neurons after retroviral infection [28].

Some authors [13, 14] conclude that the probable mechanism of binuclear neuron formation in embryogenesis and in adult organisms is cell fusion during their syncytial interaction. Syncytial connections and fusions of neurons are characteristic both for pathological conditions of nervous system and for certain stages of normal ontogenesis. The kinetics of syncytial fusion of living neurons and

Все эти процессы тесно связаны с иммунной системой, обеспечивающей тканевой гомеостаз как в физиологических условиях, так и при патологии [27]. В этом аспекте рассматриваются микроглиоциты [11, 12]. Однако, необходимо отметить, что биологическая и функциональная роль микроглии при формировании гетеро- и дикарионов не изучена. Хотя есть работы о прямом слиянии микроглии с пирамидными нейронами после ретровирусной инфекции [28].

В работах [13, 14] делается вывод, что вероятным механизмом формирования двуядерных нейронов в эмбриогенезе и у взрослых организмов является клеточное слияние в процессе их синцитиального взаимодействия. Синцитиальные связи и слияния нейронов являются характерной чертой и для патологии нервной системы, и для определенных стадий нормального онтогенеза. В культуре нейронов продемонстрирована кинетика синцитиального слияния живых нейронов и формирования таким способом двуядерных клеток. Это явилось 100% подтверждением возможности образования сложных клеточных композиций в нервной ткани путем слияния. Приведены данные, демонстрирующие, что щелевые контакты способны превращаться в синцитиальные перфорации, а соматические щелевые контакты при благоприятных условиях могут преобразовывать нейроны в дикарионы. То есть, перфорация, постепенно охватывая цитоплазму обеих сливающихся клеток, превращает их в бинуклеарный нейрон [13, 14, 29]. Это преобразование распространено и на нейроглиальные взаимоотношения с добавлением возможности перепрограммирования ядра глиальной клетки [20].

Таким образом, гипотеза о роли слияния клеток в физиологической и репаративной регенерации нервной ткани имеет право на существование. Поэтому необходимы дальнейшие исследования в этом направлении. В настоящей работе проведено гистологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследование различных двуядерных пирамидных нейронов (гетеро- и дикарионов) слоя III и V сенсоромоторной коры головного мозга половозрелых белых крыс в норме и после 40-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Материал и методы

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическими комитетами вуза (протокол № 83 от 14 октября 2016 года; протокол № 107 от 2 октября 2018 года). Использовали аутбредных половозрелых крыс стока Wistar (самцы масса 270–350 гр.). Животных содержали в стандартных лабораторных усло-

formation of binuclear cells in this way was demonstrated in neuronal culture. This provided a solid proof for the possibility of formation of complex cell structures in neural tissue by fusion. Data demonstrating that gap junctions are capable of transforming into syncytial perforations, and somatic gap junctions, under favorable conditions, can transform neurons into dikaryons, have been published. This suggests that perforation, gradually embracing the cytoplasm of both fusion cells, transforms them into a binuclear neuron [13, 14, 29]. This transformation is extended to the neuroglial interactions with the added possibility of glial cell nucleus reprogramming [20].

Thus, the hypothesis of the role of cell fusion in physiological and reparative regeneration of nervous tissue can be considered valid. Therefore, further research in this direction is necessary. In the present work we carried out histological, immunohistochemical and morphometric study of different binuclear pyramidal neurons (hetero- and dikaryons) of layer III and V of sensorimotor cortex of mature white rats in intact condition and after 40-minute occlusion of common carotid arteries.

Materials and Methods

The study was performed at the Omsk State Medical University after being approved by the ethical committees of the university (Minutes № 83, October 14, 2016; Minutes № 107, October 2, 2018). Outbred sexually mature Wistar rats (males weighing 270–350 g) were used. Animals were kept in standard laboratory conditions, the experiment was carried out according to the «Rules of work with experimental animals» (Appendix to the order of the Ministry of Health of the USSR from 12.08.77 №755) and with the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science, supported by WHO, and Directive of the European Parliament № 2010/63/EU dated 22.09.10 «On protection of animals used for scientific purposes».

Acute incomplete cerebral ischemia was simulated by 40-minute occlusion of the common carotid arteries (OCCA) without hypotension. The choice of this model was due to the fact that binucleate cellular structures after incomplete ischemia in the neocortex, in contrast to focal complete ischemia, have not been studied [19, 20]. The experiment was performed under anesthesia with Zoletil 100 (5–7 units). Intact rats ($n=5$) served as a control. At 1, 3 and 7 days after OCCA ($n=15$, 5 rats per each time point) the brains were fixed by perfusion with sequential injection of 100–125 ml of 0.9% NaCl solution and dalteparin sodium (5,000 units) and 30 ml of 4% paraformaldehyde solution on phosphate buffer (pH 7.2–7.4). The obtained material was embedded in homogenized paraffin (HISTOMIX®) using an STP 120. Serial frontal sections (4 µm thickness) were prepared using an HM 450 microtome (Thermo) at the sensorimotor cortex level.

Cell identification (nerve/glial cells) of SMC was performed on Nissl, hematoxylin and eosin stained preparations as well as by immunohistochemical reaction for NSE, HSP-70, MAP-2 (neurons), GFAP (astro-

виях, эксперимент проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77 №755) и с рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

Острую неполную ишемию головного мозга моделировали путем 40-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА) без гипотензии. Выбор этой модели был обусловлен тем, что двуядерные клеточные образования после неполной ишемии в неокортексе, в отличие от фокальной полной ишемии, не изучались [19, 20]. Эксперимент проводили под наркозом: Zoletil 100 (5–7 единиц). Контролем служили интактные крысы ($n=5$). Через 1, 3 и 7 суток после ООСА ($n=15$, по 5 крыс на срок) мозг фиксировали перфузией последовательным введением 100–125 мл раствора 0,9% NaCl и Фрагина (5000 единиц) и 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,2–7,4). Полученный материал с помощью автомата «STP 120» заключали в гомогенизованный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы (толщина 4 мкм) готовили с помощью микротомы HM 450 (Thermo) на уровне сенсомоторной коры (СМК).

Идентификацию клеток (нейрон/глия) СМК проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, по Нисслию, а также при иммуногистохимической реакции на NSE, HSP-70, MAP-2 (нейроны), GFAP (астроциты) и AIF-1 (микроглия). Численную плотность пирамидных нейронов и астроцитов определяли при окраске по Нисслию. Цитоскелет нейронов (тела и отростки) изучали с помощью реакции на MAP-2, который обратимо связывается с микротрубочками цитоскелета, способствуя их полимеризации. Цитоскелет астроцитов изучали с помощью реакции на GFAP, который образует промежуточные филаменты. Распределение синаптических терминалей вокруг нейронов — с помощью p38 (синаптофизин) и caspase-3. Использование для верификации терминалей caspase-3, наряду с p38, обусловлено тем, что этот плейотропный фермент апоптоза принимает активное участие в синаптической пластичности и, как p38, локализуется в терминалях [30]. Микроглиоциты верифицировали с помощью специфической для этих клеток реакции на AIF-1 (аллотрансплантат воспалительного фактора 1), также известный как ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1 (IBA1). Оценку пролиферативной активности клеток нервной ткани СМК проводили с помощью реакции на Ki-67, который является ядерным антигеном и обнаруживается на протяжении всего клеточного цикла, а покоящимися клетками не экспрессируется.

Для иммуногистохимического исследования использовали поли- и моноклональные антитела. NSE, HSP-70 — кроличьи поликлональные антитела к крысиному антигену; разведение 5–20 мкг/мл (Cloud-Clone Corp.). MAP-2 — кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (ab32454, Abcam, США). GFAP — мышьиные моноклональные

cytes), and AIF-1 (microglia). The numerical density of pyramidal neurons and astrocytes was determined by Nissl staining. The cytoskeleton of neurons (bodies and processes) was studied using the reaction for MAP-2, which reversibly binds to microtubules of the cytoskeleton causing their polymerization. The cytoskeleton of astrocytes was studied by reaction for GFAP, which forms intermediate filaments. Distribution of synaptic terminals around neurons was studied using p38 (synaptophysin) and caspase-3. The use of caspase-3 for terminal verification, along with p38, is due to the fact that this pleiotropic enzyme of apoptosis takes an active part in synaptic plasticity and, like p38, is localized in the terminals [30]. Microglial cells were verified using a cell-specific reaction for AIF-1 (allograft inflammatory factor 1), also known as ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (IBA1). The proliferative activity of SMC neural tissue cells was assessed using the reaction for Ki-67, which is a nuclear antigen detectable throughout the cell cycle and not expressed by resting cells.

Poly- and monoclonal antibodies were used for immunohistochemical studies. NSE, HSP-70 were detected with rabbit polyclonal antibodies to rat antigen with 5–20 µg/ml dilution (Cloud-Clone Corp.). For MAP-2 we used rabbit polyclonal antibodies, 1 µg/ml dilution (ab32454, Abcam, USA). GFAP were detected using ready-to-use murine monoclonal antibodies, clone GA5 (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK). p38 (synaptophysin) was diagnosed by ready-to-use murine monoclonal antibody, clone 27G12 (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, United Kingdom). Caspase-3 was detected using murine monoclonal antibodies, clone 3CSP03, 1:25 dilution (Diagnostic BioSystems Inc., USA). For AIF-1 detection the rabbit polyclonal antibodies, 5–20 µg/ml dilution (Cloud-Clone Corp.) were employed. Ki-67 was measured by ready-to-use murine monoclonal antibody, MIB-1 clone (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK).

Immunohistochemical reaction was performed on sections placed on polylysine-coated slides. After reaction with primary antibodies, the sections were incubated with appropriate secondary antibodies, DAB (3,3'-diaminobenzidine) chromogen, stained with hematoxylin, and embedded in polystyrene. A NovolinkTM (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd., United Kingdom) kit was used for imaging.

The preparations were photographed using a Leica DM 1000 microscope (×100 objective, GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB camera, pixel size 1.4×1.4 µm), and images were saved as tiff files (2592×1944 pixels). For maximum contrast and sharpness, we performed image correction using the Camera Raw filter (contrast, white balance, and sharpness) in Photoshop CC. Further morphometric study was performed using ImageJ 1.52s software. To generate the ordered sample, we used randomly selected (macro by x/y coordinates) color images of the neocortex with 10 regions of interest of 50 µm×50 µm from each section, saved as stacks. The generation of final samples (randomization) of visual fields for each time period ($n=30$, per time point) was done based on the obtained arrays (100 stacks) of data using a random number generator in Statistica 8.0 software. Thus, 30 randomly selected visual

антитела, клон GA5, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). p38 (синаптофизин) — мышинные моноклональные антитела, клон 27G12, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Caspase-3 — мышинные моноклональные антитела, клон 3CSP03, разведение 1:25 (Diagnostic BioSystems Inc., США). AIF-1 — кроличьи поликлональные антитела, разведение 5–20 мкг/мл (Cloud-Clone Corp.). Ki-67 — мышинные моноклональные антитела, клон MIB-1, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

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

Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (объектив $\times 100$, камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size $1,4 \times 1,4 \mu\text{m}$), изображение сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей). Для достижения максимальной контрастности и четкости изображения проводили коррекцию с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость) в Photoshop CC. Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.52 s. Для формирования вариационных рядов использовали случайным образом отобранные (макрос по координатам x/y) цветные изображения неокортекса — 10 областей интересов размером $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ с каждого среза, сохраненные в виде стеков. Формирование окончательных выборок (рандомизация) полей зрения для каждого срока ($n=30$, на срок) проводили из полученных массивов (100 стеков) данных с помощью генератора случайных чисел в программе Statistica 8.0. Таким образом, для каждого метода окраски на срок отбирали по 30 случайно выбранных полей зрения (область интереса) СМК. Общую численную плотность пирамидных нейронов в слоях III и V СМК (пересчет на 1 mm^2) определяли по наличию ядрышек на срезах перикарионов (окраска по Нисслю). Использование подобного подхода обусловлено тем, что ядрышко являлось чрезвычайно устойчивой структурой нейрона. Его размеры и форма не изменялись даже в клетках с явными ультраструктурными признаками ишемического повреждения ядра и цитоплазмы [2]. Отдельно рассчитывали содержание нейронов с двумя ядрами, с одним и более одного ядрышка. Определяли содержание (%) нормо- и гиперхромных нейронов (несморщенных и пикноморфных). Для морфометрического анализа также использовали иммуногистохимическую реакцию на Ki-67 (пролиферативная активность ядер) и AIF-1 (численная плотность микроглиоцитов). Все остальные реакции (NSE, HSP-70, MAP-2, p38, caspase-3, GFAP) использовали для идентификации со-

fields (region of interest) of SMC were selected for each staining method per time point. The total numerical density of pyramidal neurons in layers III and V of SMC (calculated per 1 mm^2) was determined by the presence of nucleoli on perikaryon sections (Nissl staining). This approach was used due to the extreme stability of the neuronal nucleolus. Its size and shape did not change even in cells with obvious ultrastructural signs of ischemic damage of nucleus and cytoplasm [2]. The content of neurons with two nuclei, with one and more nucleolus were calculated separately. We determined the percentage (%) of normochromic and hyperchromic neurons (nonshrunken and pycnomorphic). Immunohistochemical reaction for Ki-67 (proliferative activity of nuclei) and AIF-1 (numerical density of microglial cells) was also used for morphometric analysis. All other reactions (NSE, HSP-70, MAP-2, p38, caspase-3, GFAP) were performed to identify the corresponding structures by specific proteins.

Statistical hypotheses were tested using nonparametric criteria (Mann–Whitney *U*-test, Kruskal–Wallis ANOVA, Fisher's test) using Statistica 8.0 software (StatSoft) [31]. Quantitative data in the study are reported as median (Me —50% quartile) and interquartile range (Q1–Q3, or 25–75% quartiles), fractions, percentages. The null hypothesis was rejected with Bonferroni correction at $P < 0.01$.

Results and Discussion

In layers III and V of the SMC of control animals, typical medium-sized (perikaryon $170\text{--}250 \mu\text{m}^2$) and large ($350\text{--}520 \mu\text{m}^2$) normochromic pyramidal neurons with a large light nucleus containing a single nucleolus and small amounts of heterochromatin dominated (Fig. 1 *a, b*).

In immunohistochemical reactions, the bodies and processes of pyramidal neurons were consistently filled with the marker for MAP-2 (Fig. 1 *c*) and NSE (Fig. 1 *d*). Around the neurons (at the perikaryon and apical dendrites) numerous synaptic terminals (rounded, high-density structures) were located, which were clearly visible in immunohistochemical reactions for p38 (synaptophysin) and caspase-3. In these reactions, the SMC neuropil is represented by a homogeneous substrate of densely arranged DAB chromogenic dots (Fig. 1 *e, f*). Immunohistochemical reactions (NSE, MAP-2, p38, and caspase-3) produced images in which the perikaryon compartment was visually «cut off» from the surrounding neuropil structures. This allowed us to clearly visualize complex cellular structures of the binucleate hetero- and dikaryons (Fig. 1 *c*) type, previously found in the neocortex by other authors mainly using classical histological staining methods [17–19].

Astrocyte bodies ($8\text{--}10 \mu\text{m}$) and processes were seen as a network that filled the space between the SMC perikaryons. Astrocyte bodies were round with a narrow band of cytoplasm around the nucleus containing GFAP. Astrocytes were often detected in close contact with the perikaryon, but never inside it (Fig. 2).

ответствующих структур по специфическим белкам.

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями (Mann–Whitney *U*-test, ANOVA Kraskel-Wallis, χ^2 -критерий, Фишера) с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft) [31]. Количественные данные в исследовании представлены медиана (Me — 50% квартиль) и интерквартильный разброс (Q1–Q3 — 25–75% квартили), доли, проценты. Нулевая гипотеза отвергалась с учетом коррекции Бонферрони при $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

В слоях III и V СМК животных контрольной группы преобладали типичные одноядерные средние (перикарион 170–250 мкм²) и крупные (350–520 мкм²) нормохромные пирамидные нейроны с крупным светлым ядром, содержащим одно ядрышко и небольшое количество гетерохроматина (рис. 1, *a, b*).

При иммуногистохимических реакциях тела и отроски пирамидных нейронов были равномерно заполнены маркером на MAP-2 (рис. 1, *c*) и NSE (рис. 1, *d*). Вокруг нейронов (на перикарионе и апикальных дендритах) располагалось большое количество синаптических терминалей (округлые структуры высокой плотности), которые хорошо видны при иммуногистохимической реакции на p38 (синаптофизин) и caspase-3. При этих реакциях нейропил СМК представлен однородным субстратом из плотно расположенных точек хромогена DAB (рис. 1, *e, f*). Иммуногистохимические реакции (NSE, MAP-2, p38 и caspase-3) создавали изображения, на которых компартмент перикариона визуально «отсекался» от окружающих структур нейропиля. Это позволяло хорошо видеть

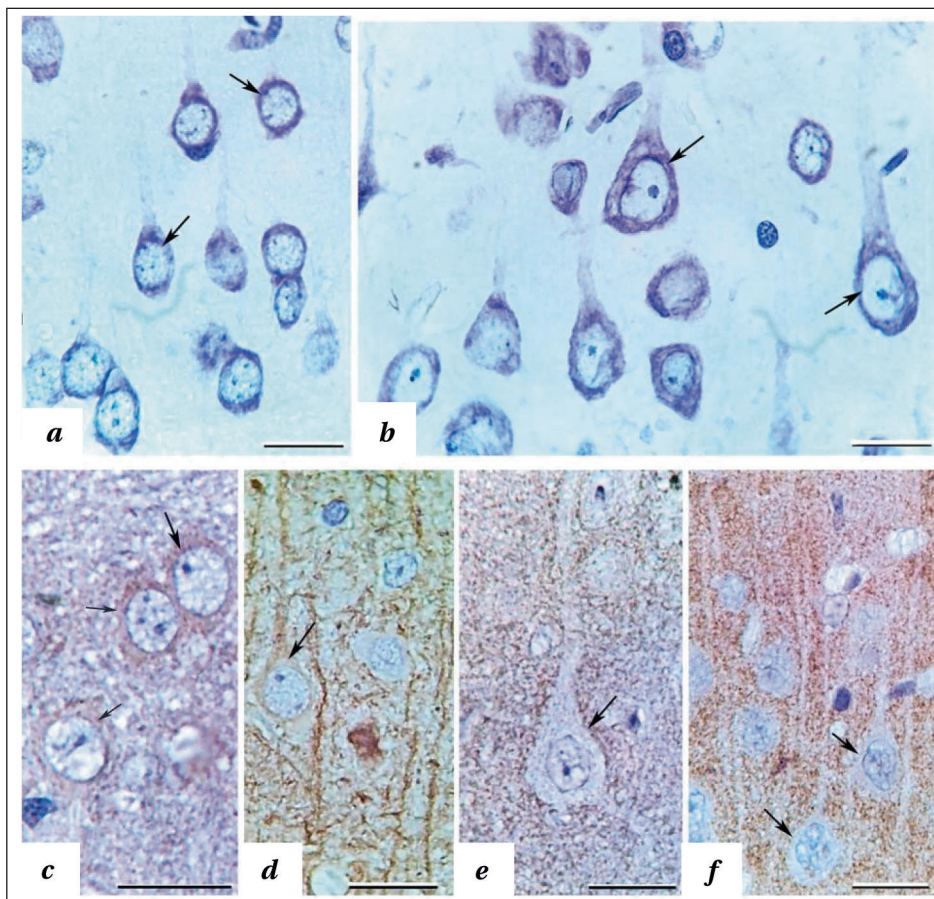


Рис. 1. Нейроны слоя III (*a, c, d, f*) и V (*b, e*) сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме.

Fig. 1. Neurons of layer III (*a, c, d, f*) and V (*b, e*) of the sensorimotor cortex of intact white rats.

Note. Normochromic pyramidal neurons predominate, uniformly filled with MAP-2-positive material (*d*), p38- (*e*) and caspase-3-positive (*c*) synaptic terminals are located around the bodies and dendrites of pyramidal neurons in the neuropil. Pyramidal neurons are indicated by the arrows. Nissl staining (*a, b*), immunohistochemical reaction for NSE (*c*), MAP-2 (*d*), p38 (*e*), and caspase-3 (*f*). Magnification $\times 100$; scale 20 μm

Примечание. Преобладают нормохромные пирамидные нейроны, равномерно заполненные MAP-2-позитивным материалом (*d*), вокруг тел и дендритов пирамидных нейронов, в нейропиле располагаются p38- (*e*) и caspase-3-позитивные (*c*) синаптические терминали. Стрелки – пирамидные нейроны. Окраска по Ниссию (*a, b*), иммуногистохимическая реакция на NSE (*c*), MAP-2 (*d*), p38 (*e*) и caspase-3 (*f*). Объектив $\times 100$; шкала — 20 мкм.

In intact animals, small (21.2 [30.8–42.6] μm^2) inactive microglial cell with an oval nucleus (5 \times 7.5 μm) and thin processes prevailed in SMC, which were detected as part of glio-microvascular complexes (Fig. 3 *a*), in a free state in neuropil (Fig. 3 *b*), and in close contact with perikaryons without ODCs (Fig. 3 *c*) and in combination with them (Fig. 3 *g*). At the same time, we observed binucleate cell structures in which MGC nuclei were in contact with neuronal nuclei, which indicated deep invagination of MGCs into the perikaryon (Fig. 3 *c*). The latter was also characteristic of the ODCs (Fig. 3 *g*).

After acute ischemia induced by 40-minute OCCA, pyramidal neurons of layers III and V of the SMC underwent hydropic and protein dystrophy, necrobiosis with hypo-, hyperchromia, and

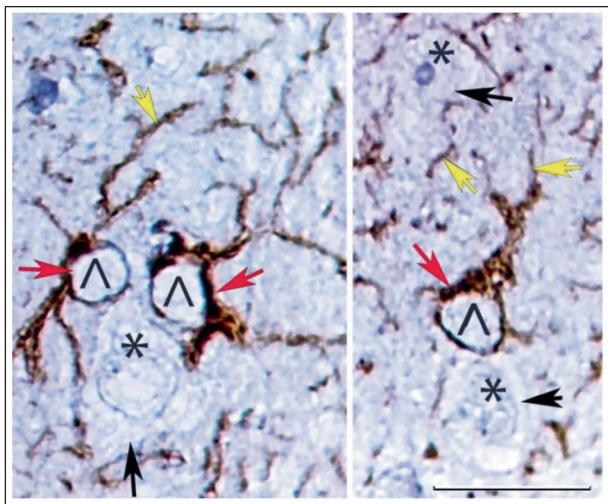


Рис. 2. Астроциты слоя III сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме.

Fig. 2. Astrocytes of layer III of the sensorimotor cortex of intact white rats.

Note. The bodies (red arrows) and processes (yellow arrows) of astrocytes (^) fill the space between perikaryons (black arrows) like a network; astrocyte bodies are in close contact with perikaryon. * — nuclei of pyramidal neurons. Immunohistochemical reaction for GFAP. Magnification $\times 100$; scale 20 μm .

Примечание. Тела (красные стрелки) и отростки (желтые стрелки) астроцитов (^) в виде сети заполняют пространство между перикарионами (черные стрелки), тела астроцитов в тесном контакте с перикарионом. * — ядра пирамидных нейронов. Иммуногистохимическая реакция на GFAP. Объектив $\times 100$; шкала — 20 мкм.

сложные клеточные образования типа двуядерных гетеро- и дикарионов (рис. 1, c), описанных ранее в неокортексе другими авторами в основном при классических гистологических методах окрашивания [17–19].

Тела астроцитов (8–10 мкм) и их отростки были представлены в виде сети, которая заполняло пространство между перикарионами СМК. Тела астроцитов имели круглую форму, узкая полоса цитоплазмы вокруг ядра содержала GFAP. Астроциты часто выявлялись в тесном контакте с перикарионами, но никогда их не было внутри перикариона (рис. 2).

В норме в СМК преобладали мелкие — 21,2 (30,8–42,6) мкм² — неактивные микроглиоциты с овальным ядром (5 \times 7,5 мкм) и тонкими отростками, которые выявлялись в составе глио-микроваскулярных комплексов (рис. 3, a), свободно в нейропиле (рис. 3, b), а также в тесном контакте с перикарионами без (рис. 3, c) и в сочетании с ОДЦ (рис. 3, d). При этом отмечали двуядерные клеточные композиции, в которых ядра МГЦ контактировали с ядрами нейронов, что свидетельствовало о глубокой инвазии МГЦ в перикарион (рис. 3, c). Последнее было также свойственно и для ОДЦ (рис. 3, d).

После острой ишемии, вызванной 40-минутной ООСА, пирамидные нейроны слоев

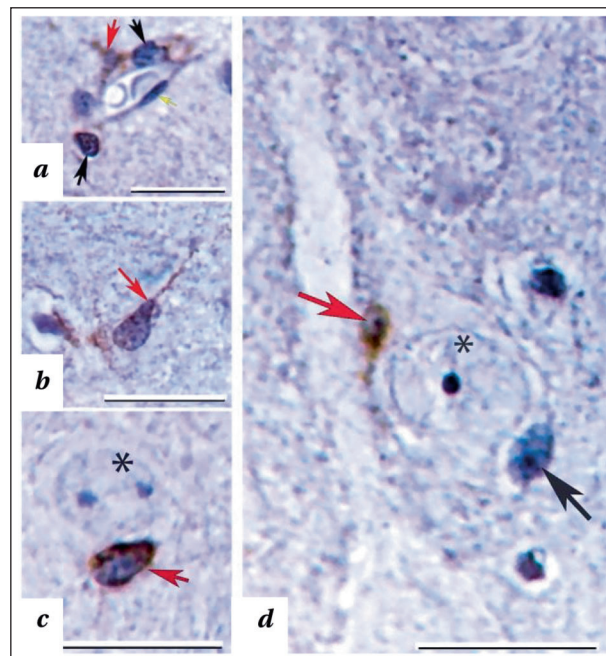


Рис. 3. Слой III (a, b, c) и V (d) сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме.

Fig. 3. Layer III (a, b, c) and V (d) of the sensorimotor cortex of the intact white rat brain.

Note. Inactive microglia (red arrows) with processes are predominant and are detected as part of the glio-microvascular complex (a), in the neuropil (b), in close contact with the perikaryon without oligodendrocytes (c) and in combination with them (d). * — pyramidal neurons, black arrows indicate oligodendrocytes. Immunohistochemical reaction for AIF-1. Magnification $\times 100$; scale 20 μm .

Примечание. Преобладают неактивные микроглиоциты (красные стрелки) с отростками, которые выявляются в составе глио-микроваскулярного комплекса (a), в нейропиле (b), в тесном контакте с перикарионом без (c) и в сочетании с олигодендроцитами (d). * — пирамидные нейроны, черные стрелки — олигодендроциты. Иммуногистохимическая реакция на AIF-1. Объектив $\times 100$; шкала — 20 мкм.

perikaryon shrinkage, and phagocytosis. However, hyperchromic staining pattern without neuronal shrinkage and with it predominated. Different degrees of vacuolization, hyperchromia, and perikaryon shrinkage (high heteromorphism of altered neurons) were noted in neighboring areas of SMC. A large number of glial cells, such as ODCs, astrocytes and MGCs included into in glio-microvascular complexes, in neuropil, in close contact with perikaryons and dendrites, in phagocytic structures were noted (Fig. 4). Thus, 3 days after OCCA, the neuroglial index of SMC increased from 1.62 (1.53–1.81) to 2.72 (2.48–3.10) (median; Mann-Whitney U Test; $P=0.001$).

Changes in neurons and glial cells were accompanied by increased proliferation of SMC neural tissue cells. In intact animals, only 6.2 (95% CI: 2.4–12.9) out of 100 neuroglial cells in SMC had Ki67-positive nuclei. 3 days after OCCA, this content increased to 18.6% (95% CI: 11.6–27.6%)

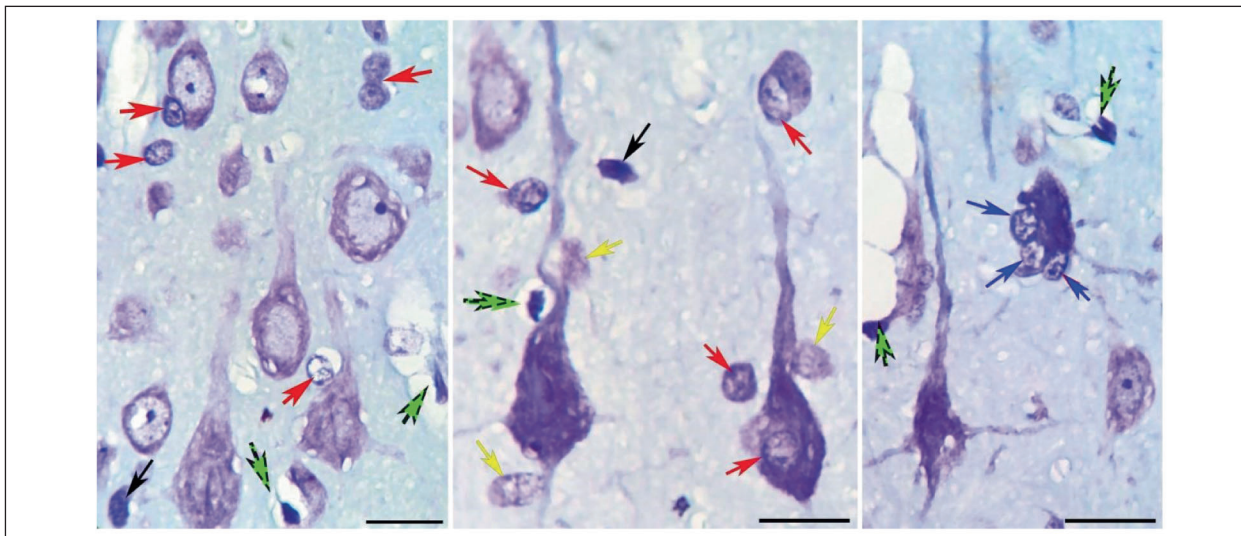


Рис. 4. Пирамидные нейроны и глиоциты слоя V сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в постишемическом периоде (3-е суток).

Fig. 4. Pyramidal neurons and gliocytes of layer V of the sensorimotor cortex in white rats post ischemia (day 3).

Note. Various degrees of hyperchromic vacuolization and pericaryon shrinkage (arranged in ascending order of severity); large number of glial cells seen as round dark oligodendrocytes (red arrows), lighter astrocytes (yellow arrows), dark oval or irregularly shaped (black arrows) and rounded (blue arrows) microglia cells around a pyknotic neuron. Green arrows indicate capillaries with endothelial cells and perivascular edema. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 100$; scale 20 μm .

Примечание. Разная степень вакуолизации гиперхромии и сморщивания перикарионов (расположены в порядке нарастания признака); большое количество глиальных клеток — круглых темных олигодендроцитов (красные стрелки), более светлых астроцитов (желтые стрелки), темных овальных или неправильной формы (черные стрелки) и вокруг пикноморфного нейрона округлых (синие стрелки) микроглиоцитов. Зеленые стрелки — капилляры с эндотелиальными клетками, периваскулярный отек. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив $\times 100$; шкала — 20 мкм.

III и V СМК подвергали гидропической и белковой дистрофии, некробиотическим изменениям с гипо-, гиперхромией и сморщиванием перикарионов, а также процессам фагоцитоза. Однако, преобладали гиперхромные тинкториальные изменения без и со сморщиванием нейронов. В соседних участках СМК отмечали разную степень вакуолизации, гиперхромии и сморщивания перикарионов (высокая гетероморфность измененных нейронов). Отмечали большое количество глиальных клеток — ОДЦ, астроцитов и МГЦ в составе глио-микроваскулярных комплексов, в нейропиле, в тесном контакте с перикарионами и дендритами, в составе фагоцитирующих структур (рис. 4). Так, через 3-е суток после ООСА нейроглиальный индекс СМК увеличивался от 1,62 (1,53–1,81) до 2,72 (2,48–3,10) (медиана; Mann–Whitney *U*-test; $p=0,001$).

Изменения нейронов и глиальных клеток сопровождалось увеличением пролиферативной активности клеток нервной ткани СМК. В норме из 100 нейроглиальных клеток СМК только 6,2 (95% ДИ: 2,4–12,9) имели Ki67-позитивные ядра. Через 3-е суток после ООСА этот показатель увеличивался до 18,6% (95% ДИ: 11,6–27,6%) ($\chi^2=5,9$, $d_f=1$, $p=0,01$). Более высокая плотность клеток нейроглии увеличивала физический контакт с нейронами, способствуя их слиянию [29].

Таблица 1. Содержание (доля) нормохромных нейронов с двумя и более ядрышками в слое III и V сенсомоторной коры мозга крыс в норме и постишемическом периоде.

Table 1. Percentage of normochromic neurons with two or more nucleoli in layer III and V of the sensorimotor cortex in intact animals and post ischemia.

Time point	Layers	
	III	V
Baseline	15/200	8/200 $p=0,20^{\text{III-V}}$
Day 1	52/200 $P=0,00001^*$	22/200 $P=0,01^*$, $\chi^2=14,0$; $P=0,0002^{\text{III-V}}$
Day 3	57/200 $P=0,00001^*$ $\chi^2=0,20$; $P=0,65^\#$	29/200 $P=0,0004^*$ $\chi^2=10,8$; $P=0,001^{\text{III-V}}$
Day 7	100/200 $P=0,00001^*$ $\chi^2=18,5$; $P<0,0001^\#$	49/200 $P<0,00001^*$ $\chi^2=5,75$; $P=0,01^\#$ $\chi^2=26,7$; $P<0,0001^{\text{III-V}}$

Note. * — vs the control (Fisher criterion); # — vs the previous time point; ^{III-V} — between the layers (Fisher criterion, χ^2 criterion). The null hypothesis was rejected after Bonferroni correction at $P\leq 0,01$. In each time point 200 nucleolated neurons were assessed.

Примечание. Time point — время исследования; baseline — норма; day — сутки; layers — слои. * — сравнение с контролем (критерий Фишера); # — предыдущим сроком; ^{III-V} — между слоями (критерий Фишера, критерий χ^2). Нулевая гипотеза отвергалась с учетом коррекции Бонферрони при $p\leq 0,01$. В каждом сроке оценивали по 200 нейронов с ядрышками.

В результате появления большого количества ишемически измененных нейронов (вакуолизированных, гипо-, гиперхромных) после 40-минутной ООСА в различных случайных полях зрения СМК статистически значимо уменьшалось содержание нормохромных пирамидных нейронов (до 10–90%). Такой разброс свидетельствовал о выраженном очаговом характере тинкториальных изменений. При этом общая численная плотность нейронов через 7 суток наблюдения в слое III уменьшалась на 26,4% ($p=0,001$), в норме — 442 (352–485), а слое V — на 18,5% $p=0,01$, в норме 290 (244–331) на 1 мм² (Mann–Whitney *U*-test).

После ООСА среди сохранившихся нормохромных нейронов отмечали очаговое увеличение доли клеток с 2-я и более ядрышками в ядре. Максимальное содержание таких нейронов отмечали в слое III и V через 7 суток (табл. 1).

На фоне обратимых и необратимых изменений в СМК появлялось большое количество перикарионов с признаками разных (последовательных) стадий формирования сложных перикарионов с двумя ядрами в плоскости срезов (рис. 5). Эти стадии ранее описаны при других патологических состояниях: сближение клеток — слияние их мембран — проникновение в перикарион — образование гетеро- и дикарионов [17, 20, 29]. В процессах слияния участвовали ОДЦ и, гораздо реже, МГЦ (рис. 5). Мы предполагаем, что после ишемии реализуется два типа взаимоотношений нейронов и разных типов МГЦ — фагоцитарное (саногенез) с разрушением перикариона и не фагоцитарное (компенсация, репарация без разрушения) слияние. Вероятно, первый тип связан с амебидными МГЦ, а второй — с не активированными МГЦ.

В пользу формирования после 40-минутной ООСА гетеро- и дикарионов свидетельствовали также данные нашего иммуногистохимического исследования, позволившие по нейроспецифическим меткам получить новую информацию о пространственном расположении контактирующих клеток и нейропиля. Особенно

($\chi^2=5.9$, $d_f=1$, $P=0.01$). A higher density of neuroglia cells increased physical contact with neurons, promoting their fusion [29].

As a result of a numerous ischemic neurons (vacuolated, hypo-, hyperchromic) emerging after 40-minute OCCA, the content of normochromic pyramidal neurons decreased significantly (up to 10–90%) in various random visual fields of SMC. This variation indicated a marked focal pattern of the staining changes. The total numerical density of neurons after 7 days of observation in layer III decreased by 26.4% ($P=0.001$) (in the intact group it was 442 [352–485] per 1 mm²) and in layer V by 18.5% ($P=0.01$) (in the intact group it was 290 [244–331]) per 1 mm² (Mann–Whitney *U* Test).

A focal increase in the fraction of cells with 2 and more nucleoli was observed among the preserved normochromic neurons after OCCA. The maximum content of such neurons in layers III and V was noted after 7 days (table 1).

Along with reversible and irreversible changes in SMC a large number of perikaryons with the signs of different (sequential) stages of complex perikaryon formation with two nuclei in the section were found (Fig. 5). These stages have been previ-

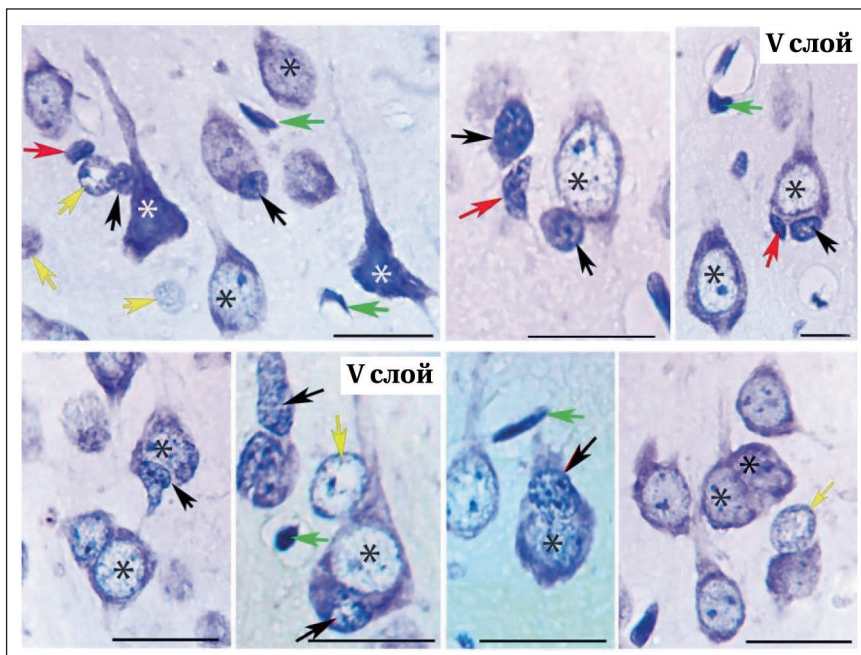


Рис. 5. Сложные клеточные композиции (гетеро- и дикарионы) в слое III и V сенсорной коры головного мозга белых крыс в постischemическом периоде (3-е суток). Fig. 5. Complex cell patterns (hetero- and dikaryons) in layer III and V of the sensorimotor cortex of white rats during the postischemic period (day 3).

Note. Different degrees of spatial distribution complexity of neural tissue cells. * — pyramidal neurons; black arrows — oligodendrocytes; yellow arrows — astrocytes; red arrows — microglia; green arrows — endothelial cells and pericytes. Nissl staining. Magnification $\times 100$; scale 20 μ m.

Примечание. Разная степень усложнения пространственного распределения клеток нервной ткани. * — пирамидные нейроны; черные стрелки — олигодендроциты; желтые стрелки — астроциты; красные стрелки — микроглиоциты; зеленые стрелки — эндотелиоциты и перициты. Окраска по Нисслю. Объектив $\times 100$; шкала — 20 мкм.

наглядно (контрастно) эти компартменты видны при реакции на p38 и caspase-3 (рис. 6).

В процессе непосредственного слияния с перикарионами участвовали, вероятно, не все типы нейроглиальных клеток. Последнее не удалось показать для астроцитов (обеих типов). Их тела только контактировали с перикарионами, не проникая за пределы внешних контуров (рис. 2, 7, a-c). Мы полагаем, что слиянию клеток препятствовал жесткий глиофибрилярный цитоскелет астроцитов, который, только в крупных ветвях одного астроцита охватывал на срезе 780–1500 мкм² и был существенно больше перикариона (площадь крупного перикариона на рис. 1 b — 370 мкм²). Однако, это не значит, что астроциты не участвовали в процессе образования гетеро- и дикарионов. Мелкие отростки протоплазматических астроцитов «окутывали» ниши, в которых происходило слияние ОДЦ и перикарионов, контролируя, вероятно, микросреду этого процесса (рис. 7, b, c).

По литературным данным и существующим гипотезам, после ишемии гетерокарионы формируются из ОДЦ и перикарионов [17, 20, 29]. Мы полагаем, что подобное представление нужно расширить и включить в число претендентов (или помощников) МГЦ. В пользу этого свидетельствует то, что эти две клетки часто встречались вместе, имели примерно одинаковые размеры, выявлялись рядом с неповрежденными нейронами (рис. 3, 5, 7), то есть, функционировали в комплексах, взаимно дополняя друг друга.

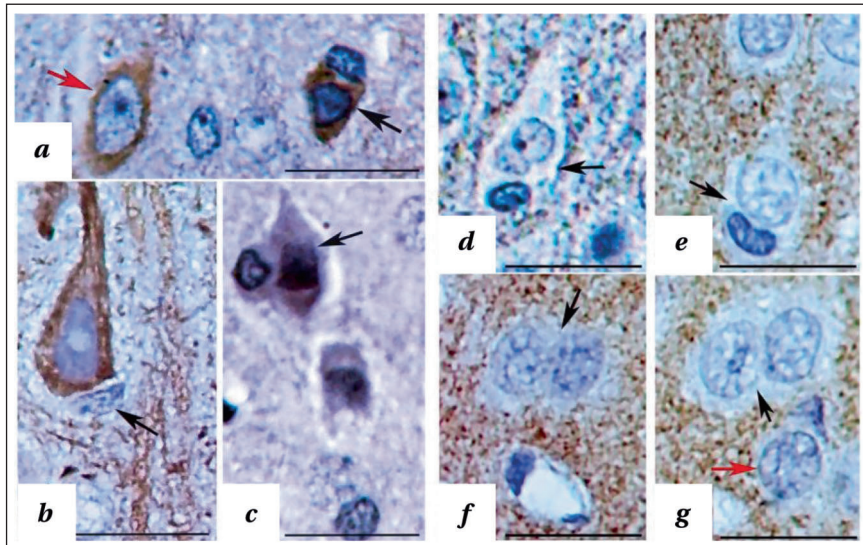


Рис. 6. Иммуногистохимическое представление пространственного соотношения специфических белков нервной ткани в двуядерных клеточных образованиях (черные стрелки) слоя III (a, e, c, f, g) и V (b, d) сенсомоторной коры головного мозга белых крыс через 1- и (a, b), 3-е (d, e, f, g) и 7 суток (c) в постинсультном периоде. **Fig. 6.** Immunohistochemical representation of the spatial relationship of specific neural tissue proteins in double-nucleated cell structures (black arrows) of layer III (a, e, c, f, g) and V (b, d) of the sensorimotor cortex of white rats on days 1 (a, b), 3 (d, e, f, g), and 7 (c) post ischemia.

Note. The red arrow indicates a mononuclear neuron. Immunohistochemical reaction for NSE (a), MAP-2 (b), HSP-70 (c), p38 (d), and caspase-3 (e-g). Magnification $\times 100$; scale 20 μm . **Примечание.** Красная стрелка — одноядерный нейрон. Иммуногистохимическая реакция на NSE (a), MAP-2 (b), HSP-70 (c), p38 (d) и caspase-3 (e-g). Объектив $\times 100$; шкала — 20 мкм.

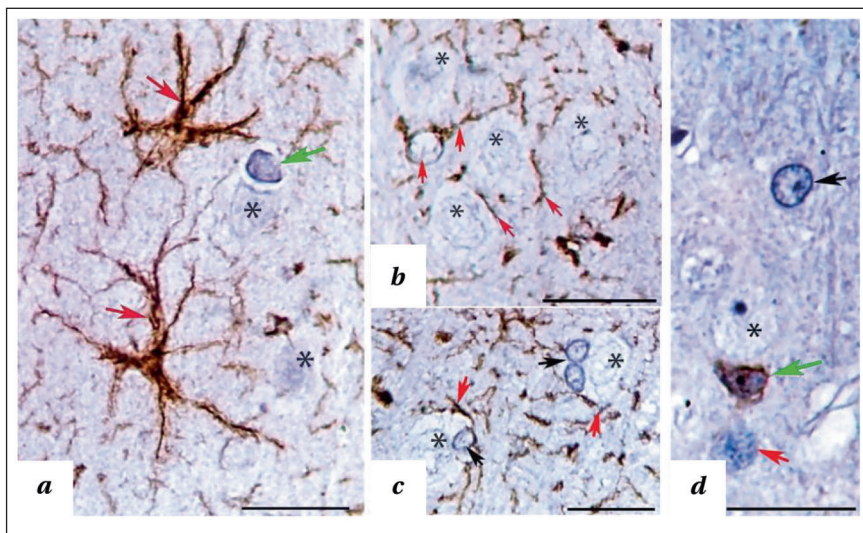


Рис. 7. Пространственное соотношение астроцитов и их отростков (красные стрелки), олигодендроцитов (черные стрелки), микроглиоцитов (зеленые стрелки) и пирамидных нейронов (*) слоя III (a, b, d) и V (c) сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в постинсультном периоде (3-е суток). **Fig. 7.** Spatial relationship between astrocytes and their processes (red arrows), oligodendrocytes (black arrows), microglia (green arrows), and pyramidal neurons (*) of layer III (a, b, d) and V (c) of the sensorimotor cortex in white rats post ischemia (day 3).

Note. Immunohistochemical reaction for GFAP (a-c) and AIF-1 (d). Magnification $\times 100$; scale 20 μm .

Примечание. Иммуногистохимическая реакция на GFAP (a-c) и AIF-1 (d). Объектив $\times 100$; шкала — 20 мкм.

Таблица 2. Общая численная плотность (на 1 мм²) всех типов микроглиоцитов и олигодендроцитов в СМК (слои III + V) белых крыс в норме и после ООСА.

Table 2. Total numerical density (per 1 mm²) of all types of microglial cells and oligodendrocytes in the SMC (layers III + V) of intact white rats and after OCCA.

Groups	Cells	
	Microgliaocytes, reaction for AIF-1	Oligodendrocytes, Nissl staining
Control, n=30 vision field	64.0 (32.0–64.0)	60.2 (30.0–68.5) <i>P</i> =0.6 ^{м-о}
Day 1, n=30	96.0 (95.0–128.0) <i>P</i> =0.0001*	65.4 (25.0–75.0) <i>P</i> =0.01*; <i>P</i> =0.0003 ^{м-о}
Day 3, n=30	78.0 (64.0–96.0) <i>P</i> =0.0002*; <i>P</i> =0.01**	57.5 (50.0–70.0) <i>P</i> =0.3*; <i>P</i> =0.01**; <i>P</i> =0.003 ^{м-о}
Day 7, n=30	78.0 (64.0–96.0) <i>P</i> =0.001*; <i>P</i> =0.64**	77.5 (52.5–87.5) <i>P</i> =0.001*; <i>P</i> =0.001**; <i>P</i> =0.8 ^{м-о}
ANOVA Between the time points (day 1, 3, 7)	H (2.N=102)=11.5; <i>P</i> =0.003 [#]	H (2.N=100)=9.2; <i>P</i> =0.01 [#]

Note. * — vs the control; ** — vs the previous time point; ^{м-о} — between the MGCs and ODCs (Mann–Whitney U Test); # — between the time points after ischemia (ANOVA Kruskal–Wallis). The null hypothesis was rejected after Bonferroni correction at *P*≤0.01. The data presented as Me (1 and 3 quartiles).

Примечание. Cells — клетки; Nissl staining — окраска по Нисслию; vision field — поле зрения; between the time points — между сроками (сутки). * — сравнение с контролем; ** — с предыдущим сроком; ^{м-о} — между микроглиоцитами и олигодендроцитами (Mann–Whitney U Test); # — между сроками после ишемии (ANOVA Kruskal–Wallis). Нулевую гипотезу отвергли с учетом коррекции Бонферрони при *p*≤0,01. Материал представили как медиану (1 и 3 квартили).

В постишемическом периоде изменялись показатели формы, количества и размеров микроглиоцитов во всех изученных слоях СМК. Как и в контроле, МГЦ выявляли вокруг сосудов, в тесной связи с перикарионами нормохромных и гиперхромных пирамидных нейронов (рис. 8). Отметим увеличение общей численной плотности микроглиоцитов на 1 мм² поля зрения СМК (табл. 2). При этом возрастала доля активных форм (амебоидные без длинных отростков, неправильной формы) клеток (от 15% в контроле до 65% через 1-и сутки; Mann–Whitney *U*-test, *p*=0,0001). Максимальную общую численную плотность всех МГЦ отметили в СМК через 1-и сутки после ООСА.

После ООСА увеличивались также размеры МГЦ. Их площадь при окраске на AIF-1 варьировалась от 23,4 до 93,1 мкм², медиана (нижний и верхний квартили) — 42,6 (31,3–51,0) мкм², а в контроле — 21,2 (30,8–42,6) мкм² (Mann–Whitney *U*-test, *p*=0,0001). На этом уровне показатели оставались через 3-е и 7 суток. По данным литературы, подобные изменения являются проявлением развития особой формы воспалительной реакции — воспаления и формирования амебоидной микроглии, для которой характерно большие размеры, неправильная форма тела, преобладание фагоцитарной функции и секреции цитокинов [8].

Сравнение динамики количества МГЦ и ОДЦ в СМК показало, что пик увеличения плотности этих клеток после ООСА отличался: для МГЦ — через 1 сутки, ОДЦ — 7 суток (табл. 2). Можно предположить, что МГЦ saniровали нервную ткань после ишемии для возможно-

ously described in other pathological conditions and include cell convergence, fusion of their membranes, penetration into perikaryon, and formation of hetero- and dikaryons [17, 20, 29]. ODCs and, much less frequently, MGCs participated in the fusion processes (Fig. 5). We suppose that after ischemia two types of interactions between neurons and different types of MGCs develop: phagocytic (in recovery) with perikaryon destruction and non-phagocytic (in compensation and repair without destruction) fusion. Probably, the first type is associated with amoeboid MGCs and the second with non-activated MGCs.

The formation of hetero- and dikaryons after 40-min OCCA was also confirmed by our immunohistochemical results, which provided new information on the spatial arrangement of the contacting cells and neuropil by neurospecific markers. These compartments are particularly clearly visible in the reaction with p38 and caspase-3 (Fig. 6).

Not all types of neuroglial cells probably participated in direct fusion with perikaryons. The latter could not be shown for astrocytes (both types). Their bodies were only in contact with the perikaryons, not penetrating beyond the outer contour (Figs. 2, 7 *a–c*). We believe that cell fusion was hindered by the rigid gliofibrillary cytoskeleton of astrocytes, which, just in the large branches of one astrocyte, covered 780–1500 μm² of the section and was significantly larger than the perikaryon (the area of the large perikaryon in Fig. 1, *b* is 370 μm²). However, this does not mean that astrocytes were not involved in the formation of hetero- and dikaryons. Small processes of protoplasmic astrocytes «enveloped» the niches in which the fusion of

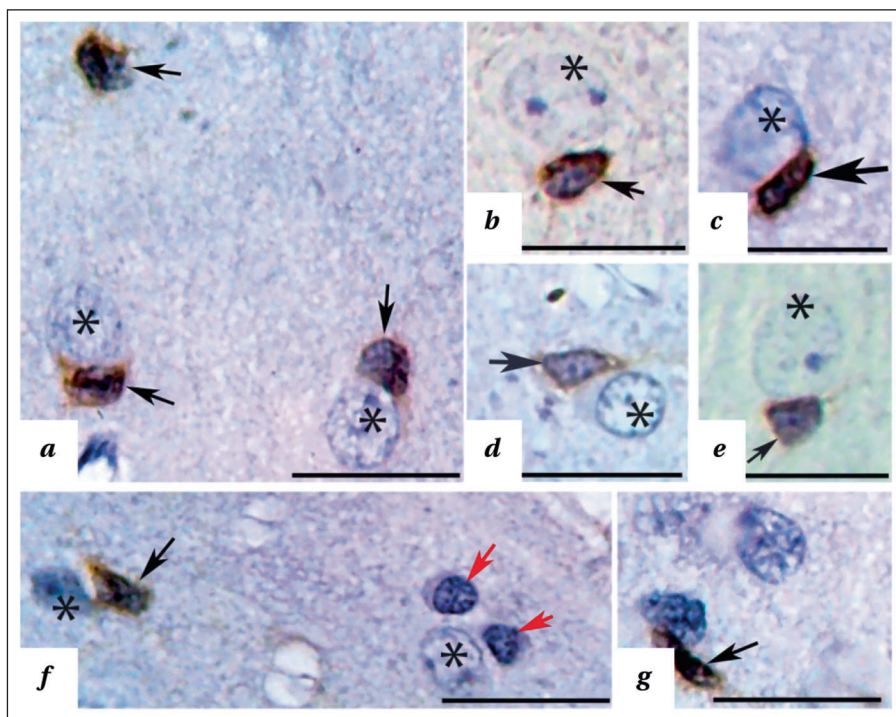


Рис. 8. Пространственное распределение микроглиоцитов (черные стрелки) и олигодендроцитов (красные стрелки) вокруг перикарионов пирамидных нейронов (*) СМК белых крыс в норме (b), через 1-и (a, c, f, g), 3-е (d) и 7 суток (e) в постиншемическом периоде.

Fig. 8. Spatial distribution of microglia (black arrows) and oligodendrocytes (red arrows) around perikaryons of pyramidal neurons (*) of white rat SMCs in intact animals (b) and after 1 (a, c, f, g), 3 (d), and 7 (e) days post ischemia.

Note. The red arrow indicates a single neuron. Immunohistochemical reaction for AIF-1. Magnification $\times 100$; scale $20 \mu\text{m}$.

Примечание. Красная стрелка — одиночный нейрон. Иммуногистохимическая реакция на AIF-1. Объектив $\times 100$; шкала — $20 \mu\text{м}$.

сти последующего более полноценного ее структурно-функционального восстановления с участием ОДЦ.

Суммируя результаты гистологического (гематоксилин и эозин, метод Ниссля) и иммуногистохимического (NSE, HSP-70, MAP-2) исследования (150 полей зрения на каждый срок с последующей рандомизацией до 30), установили, что численная плотность гетеро- и дикарионов в СМК контрольных животных составляла $3,5 (1,5-4,0)/\text{мм}^2$, через 1-и 3-е суток после ООСА оставалась на уровне контрольного значения — $4,0 (2,0-4,5)$ ($p=0,20$) и $4,0 (2,5-5,0)/\text{мм}^2$ ($p=0,35$), а через 7 суток, в сравнении с контролем, статистически значимо увеличивалась до $6,5 (5,0-8,5)/\text{мм}^2$ (Mann-Whitney U-test; $p=0,002$). Увеличение количества гетеро- и дикарионов происходило на фоне более высокого, чем в контроле, содержания ОДЦ и МГЦ.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствовали о том, что после 40-минутной ООСА в СМК на фоне уменьшения общей численной плотности пирамидных нейронов и активации нейрогли-

ODCs and perikaryons took place, controlling, probably, the microenvironment of this process (Fig. 7 b, c).

According to the literature and existing hypotheses, heterokaryons are formed after ischemia from ODCs and perikaryons [17, 20, 29]. We believe that this view should be expanded to include MGCs as candidate helpers. This is supported by the fact that these two cells were often found together, had approximately the same size, and were detected next to intact neurons (Figs. 3, 5, 7). In other words, they functioned together, mutually complementing each other.

In the postischemic period, the shape, number and size of microglial cells in all the studied layers of SMC changed. As in the control, MGCs were detected around the vessels, in close association with the perikaryons of normochromic and hyperchromic pyramidal neurons (Fig. 8). There was an

increase in the total numerical density of microglial cells per 1 mm^2 of the SMC visual field (Table 2). At the same time, the proportion of active forms (amoeboid cells without long processes, with irregular shapes) increased from 15% in the control to 65% after 1 day (Mann-Whitney U Test, $P=0.0001$). The maximum total numerical density of all MGCs was observed in the SMC 1 day after OCCA.

The size of MGCs also increased after OCCA. Their area when stained for AIF-1 ranged from 23.4 to $93.1 \mu\text{m}^2$, with a median (lower and upper quartiles) of $42.6 (31.3-51.0) \mu\text{m}^2$ with the control value of $21.2 (30.8-42.6) \mu\text{m}^2$ (Mann-Whitney U Test, $P=0.0001$). The parameters remained at this level after days 3 and 7. According to the literature, such changes represent a special inflammatory response, inflammation and amoeboid microglia formation, which is characterized by large size, irregular body shape, predominance of phagocytic function and cytokine production [8].

Comparing the changes in the number of MGCs and ODCs in the SMC showed that the maximum increase in the density of these cells after OCCA was different for MGCs (after 1 day) and

альных клеток происходил незначительный сдвиг баланса между слиянием или индивидуальной целостностью нейронов и глиальных клеток в сторону увеличения образования гетерокарионов.

В сравнении с контролем через 7 суток после 40-минутной ООСА в СМК увеличивалось содержание гетерокарионов. Однако как трактовать это увеличение, его роль в аспекте функциональности непонятно. Последнее связано с тем, что клетки с двойными ядрами в норме составляли около 1%, а после ООСА — 1,5% всех пирамидных нейронов СМК. Как они могли критически изменить межнейронные связи, неизвестно.

Тем не менее, роль слияния клеток в нервной ткани изучается. Известно, что в ней экспрессируются фузогены — специализированные молекулы, необходимые для слияния клеток, которые активируются в условиях вирусной инфекции, стресса или других патологических состояний. Аберрантная экспрессия фузогенов приводит к слиянию нейронов и изменениям их функции. Дикарионы, полученные в результате слияния двух нейронов, сохраняют свою жизнеспособность, становятся электрически связанными, теряя при этом индивидуальность, что, по мнению авторов, приводит к изменению нейронных цепей и нарушению их нормального функционирования [32].

Каковы последствия слияния нейронов и глиальных клеток неизвестно [23]. Некоторые авторы относят гетеро- и дикарионы к особым формам регенерации нервной ткани — достижение диплоидии, минуя митотическое деление клеток, без использования резерва стволовых клеток головного мозга. Это позволяет сохранять архитектуру уже имеющихся нейронных сетей, усиливать часть ее узлов, не нарушая их функцию [13, 19].

Несомненно одно, что в нервной ткани существует баланс между слиянием и индивидуальностью клеток, гомеостатически смещенный в сторону сохранения структурно-функциональной целостности зрелых нейронов. Однако, неизвестно, как он поддерживается. Вероятно, что в поврежденной нервной ткани существуют механизмы, подавляющие неконтролируемое слияние клеток, тем самым поддерживая нейроны как отдельные единицы. Необходимо критически оценивать данные о слиянии клеток, последствия которых не понятны до сих пор. Особенно это касается процессов регенерации тканей [23, 33].

В нашем исследовании, наряду с увеличением содержания гетерокарионов, выявили значительно более выраженное (на 20–40%) увеличение доли нейронов СМК с двумя и более ядрышками. Это, вероятно, свидетельствовало

ODCs (7 days) (Table 2). We can suggest that MGCs «cleansed» the nerve tissue after ischemia for better structural and functional recovery in the future with the participation of ODCs.

Summarizing the results of histological (hematoxylin and eosin, Nissl method) and immunohistochemical (NSE, HSP-70, MAP-2) studies (150 visual fields for each time point followed by randomization to 30), we found that the numerical density of hetero- and dikaryons in SMC of control animals was 3.5 (1.5–4.0)/mm², on days 1 and 3 after OCCA remained at the control value of 4.0 (2.0–4.5) ($P=0.20$) and 4.0 (2.5–5.0)/mm² ($P=0.35$), respectively, and on day 7, compared with control, increased significantly to 6.5 (5.0–8.5)/mm² (Mann–Whitney U Test; $P=0.002$). The increase in the number of hetero- and dikaryons was accompanied by a higher level of ODCs and MGCs than in the control.

Thus, the results of our study showed that after a 40-minute OCCA, there was a slight shift in the balance between the fusion and individual integrity of neurons and glial cells towards an increase in heterocaryon formation in SMC, accompanied by a decrease in the total number of pyramidal neurons and activation of neuroglial cells.

Compared to the control, 7 days after the 40-minute OCCA, the percentage of heterokaryons increased in the SMC. However, it is not clear how to interpret this increase and its role from a functional point of view. Interestingly, the percentage of bi-nucleated cells among the pyramidal neurons of SMC was about 1% in intact animals and 1.5% after OCCA. It is unknown how they could critically alter the inter-neuronal connections.

Nevertheless, the role of cell fusion in nervous tissue is being studied. The nervous tissue is known to express fusogens, specialized molecules necessary for cell fusion, which are activated in viral infection, stress or other conditions. Aberrant expression of fusogens leads to neuronal fusion and changes in neuronal function. Dikaryons produced by the fusion of two neurons remain viable and become electrically interconnected, while losing their individual features, which, according to the authors, disrupts neuronal circuits and their normal function [32].

The consequences of neuronal and glial cell fusion are unknown [23]. Some authors consider hetero- and dikaryons as special patterns of nerve tissue regeneration, i.e., diploidy achieved without mitotic cell division and using no brain stem cell reserve. This allows preserving the architecture of the existing neural networks, strengthening some of their nodes without disrupting their function [13, 19].

One thing is certain, there is a balance in the nervous tissue between cell fusion and individual existence, which shifts toward preserving the struc-

о том, что в функционирующих нейронах, включались процессы адаптации белоксинтезирующей системы, которые проявлялись гипертрофией и амплификацией ядрышек и описаны нами ранее также для 20-минутной ООСА [2]. По данным литературы, последнее обеспечивает усиление образования рибосом, регенерацию частично поврежденных и защиту функционирующих клеток, нейропластичность [34]. Поэтому именно гипертрофию и амплификацию ядрышек после 40-минутной ООСА, не исключая роли слияния клеток, целесообразно рассматривать как ключевую адаптацию белоксинтезирующей системы нейронов.

Современные данные свидетельствуют о том, что обстоятельства слияния нейронов весьма специфичны. Хотя очень мало известно о физиологическом преимуществе или возможном вредном эффекте слияния, ясно, что оно может иметь последствия для нейрона как на субклеточном, так и на электрофизиологическом уровне [32].

Образование сложных клеточных систем в патологически измененной СМК с участием нейронов и нейроглии целесообразно рассматривать в аспекте клеточно-клеточных фагоцитарных и иных типов взаимоотношений с учетом пространственно-временных особенностей. В процессе этих взаимоотношений каждая глиальная клетка играет особую роль: МГЦ мигрирует и поглощает струму и апикальные дендриты необратимо поврежденных нейронов, астроциты — их многочисленные мелкие дендриты, ОДЦ — обеспечивают последующее восстановление аксонов сохранившихся нейронов [35, 10, 11]. А все вместе, усиливая синтез нейротрофических факторов, — репаративную реорганизацию нервной ткани в целом [1, 6, 7, 9, 27]. Однако, в особых случаях некоторые глиальные клетки и нейроны сливаются, вероятно, не для фагоцитоза, а для совместного усиления репаративного потенциала.

Полученные в работе данные послужат для уточнения основ и особенностей структурно-функциональной реорганизации нервной ткани СМК с учетом возможной активации одного из многочисленных естественных механизмов репарации — слияния клеток — после ООСА.

Заключение

После 40-минутной ООСА, на фоне диффузно-очаговых дистрофических изменений и необратимого повреждения части пирамидных нейронов, увеличивалось количество нейроглиальных клеток и повышалась вероятность образования гетеро- и дикарионов.

tural and functional integrity of mature neurons. However, it is unclear how the balance is maintained. It is likely that there are mechanisms in the damaged nervous tissue that suppress uncontrolled cell fusion, thereby maintaining neurons as separate units. It is necessary to critically evaluate the data on cell fusion whose consequences are still unclear. This is especially true for tissue regeneration processes [23, 33].

In our study, along with the increase in the fraction of heterocaryons, we revealed a significantly greater (by 20–40%) increase in the proportion of neurons with two or more nuclei in the SMC. This probably indicated that in functioning neurons, the adaptation of the protein synthesizing system manifested by hypertrophy and amplification of nucleoli was activated, which we described earlier also for the 20-min OCCA [2]. According to the literature, the latter provides enhanced ribosome formation, regeneration of partially damaged and protection of functioning cells, and neuroplasticity [34]. Therefore, hypertrophy and amplification of nucleoli after 40-min OCCA (apart from the cell fusion) can be considered as the key adaptation feature of the protein synthesizing system of neurons.

Current evidence suggests that the circumstances of neuronal fusion are highly specific. Although very little is known about the physiological advantage or possible detrimental effect of neuron fusion, it can clearly have impact at the ultracellular and electrophysiological levels [32].

The formation of complex cellular structures in altered SMC involving neurons and neuroglia should be considered from the perspective of intercellular phagocytic and other types of interactions, taking into account the spatial and temporal patterns. During this interaction, each glial cell plays a special role: MGCs migrate and ingest bodies and apical dendrites of irreversibly damaged neurons, astrocytes ingest their numerous small dendrites, while ODCs ensure subsequent recovery of axons of the preserved neurons [35, 10, 11]. And all together, by enhancing the production of neurotrophic factors, they promote integral reparative reorganization of neural tissue [1, 6, 7, 9, 27]. However, in special cases, some glial cells and neurons fuse, probably not for phagocytosis, but for the joint enhancement of reparative potential.

Our data will serve to clarify the fundamental and specific features of structural and functional reorganization of the SMC nervous tissue, taking into account the possible activation of cell fusion, a natural repair mechanism after OCCA.

Conclusion

After 40-minute OCCA, along with diffuse focal dystrophy and irreversible damage to some of the pyramidal neurons, the number of neuroglial

Активация реактивного нейроглиоза имела гетерохронный характер. Через сутки после ООСА отметили пик увеличения численной плотности микроглиоцитов, а через 7 суток — олигодендроцитов.

Среди сохранившихся нормохромных нейронов отметили очаговое увеличение доли клеток с 2-мя и более ядрышками в ядре. Содержание таких нейронов было максимальным через 7 суток после ООСА — во время пика увеличения содержания олигодендроцитов.

Участие авторов: авторы лично и в равном количестве принимали участие в реализации комплексного методологического подхода, включающего экспериментальный, анатомический, гистологический, морфометрический и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа.

Литература

1. Аврущенко М.Ш., Острова И.В. Постреанимационные изменения экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF): взаимосвязь с процессом гибели нейронов. *Общая реаниматология*. 2017; 13 (4): 6–21. DOI: 10.15360/1813-97792017-4-6-21
2. Степанов С.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Степанов А.С., Горбунова А.В. Структурно-функциональная реорганизация ядршккового аппарата нейронов неокортекса, архикортекса и базальных ганглиев головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2018; 7 (4): 67–74. DOI: 10.18499/2225-7357
3. Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Клеточные системы восстановления и утилизации поврежденных нейронов головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2017; 103 (10): 1135–1147.
4. 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
5. Oksanen M., Lehtonen, S., Jaronen, M., Goldsteins, G., Hämäläinen R.H., Koistinaho J. Astrocyte alterations in neurodegenerative pathologies and their modeling in human induced pluripotent stem cell platforms. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019; 76: 2739–2760. DOI: 10.1007/s00018-019-03111-7
6. Сахарнова Т.А., Ведунова М.В., Мухина И.В. Нейротрофический фактор головного мозга (bdnf) и его роль в функционировании центральной нервной системы. *Нейрохимия*. 2012; 29 (4): 269–277.
7. Митрошина Е.В., Абогессименгане Б.Ж., Уразов М.Д., Хамрауй И., Мищенко Т.А., Астраханова Т.А., Шелчкова Н.А., Лапшин Р.Д., Шишкина Т.В., Белоусова И.И., Мухина И.В., Ведунова М.В. Адапционная роль глиального нейротрофического фактора при ишемии головного мозга. *Современные технологии в медицине*. 2017; 9 (1): 68–77. DOI: 10.17691/stm2017.9.1.08
8. Алексеева О.С., Кирик О.В., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Микроглия головного мозга: происхождение, структура и функции. *Эволюционной биохимии и физиологии*. 2019; 55 (4): 231–241. DOI: 10.1134/S0044452919040028
9. Калинина Ю.А., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Астроциты и их участие в механизмах терапевтического действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга. *Гены и клетки*. 2019; 14 (1): 33–40. DOI: 10.23868/201903004
10. Pekny M., Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014; 94: 1077–1098. DOI: 10.1152/physrev.00041.2013
11. Cowan M., Petri Jr. W. A. Microglia: Immune regulators of neurodevelopment. *Frontiers in immunology*. 2018; 9: 2576. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02576
12. Chen Z., Zhong, D., Li, G. The role of microglia in viral encephalitis: a review. *Journal of Neuroinflammation*. 2019; 16: 76. DOI: 10.1186/s12974-019-1443-2
13. Сотников О.С., Фрумкина Л.Е., Лактионова А.А., Парамонова Н.М., Новаковская С.А. Двухядерные нейроны: синцитиальное слияние или амитоз. *Успехи физиологических наук*. 2011; 42 (4): 76–89. PMID: 22145312

cells and the rate of hetero- and dikaryons formation increased.

Activation of reactive neurogliosis was not simultaneous. The maximum increase in the numerical density of microgliaocytes was observed on day 1 after OCCA, while the maximum rise in oligodendrocytes was noted 7 days after OCCA.

Among the preserved normochromic neurons, there was a focal increase in the fraction of cells with 2 or more nucleoli in the nucleus. The percentage of such neurons was maximal 7 days after OCCA, during the maximum increase of oligodendrocytes.

Authors' participation: the authors personally and equally participated in the development and implementation of the study including experimental, anatomical, histological, morphometric and statistical techniques, as well as methods of observation, description and analysis of results.

References

1. Avrushchenko M.S., Ostrova I.V. Postresuscitative Changes of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein Expression: Association With Neuronal Death. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology*. 2017; 13 (4): 6–21 [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-4-6-21
2. Stepanov S.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Stepanov A.S., Gorbunova A.V. Structural and functional reorganization of the nucleolar apparatus of neurons of the neocortex, archicortex, and basal ganglia of the brain of white rats after 20-minute occlusion of the common carotid arteries. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2018; 7 (4): 67–74 [In Russ.]. DOI: 10.18499/2225-7357
3. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Avdeev D.B. Cellular systems of restoration and utilization of damaged neurons of the brain of white rats after 20-minute occlusion of the common carotid arteries. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2017; 103 (10): 1135–1147 [In Russ.].
4. 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
5. Oksanen M., Lehtonen, S., Jaronen, M., Goldsteins, G., Hämäläinen R.H., Koistinaho J. Astrocyte alterations in neurodegenerative pathologies and their modeling in human induced pluripotent stem cell platforms. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019; 76: 2739–2760. DOI: 10.1007/s00018-019-03111-7
6. Sakharnova T.A., Vedunova M.V., Mukhina I.V. Neurotrophic factor of the brain (BDNF) and its role in the functioning of the central nervous system. *Neirokhimiya*. 2012; 29 (4): 269–277 [In Russ.].
7. Mitroshina E.V., Abogessimengane B.Zh., Urazov M.D., Khamrauy I., Mishchenko T.A., Astrakhanova T.A., Shchelchikova N.A., Lapshin R.D., Shishkina T.V., Belousova I.I., Mukhina I.V., Vedunova M.V. Adaptive role of glial neurotrophic factor in cerebral ischemia. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2017; 9 (1): 68–77 [In Russ.]. DOI: 10.17691/stm2017.9.1.08
8. Alekseeva O.S., Kirik O.V., Gilerovich E.G., Korzhevsky D.E. Brain microglia: origin, structure and functions. *Evolutsionnoj biokhimii i fiziologii*. 2019; 55 (4): 231–241 [In Russ.]. DOI: 10.1134/S0044452919040028
9. Kalinina Yu.A., Gilerovich E.G., Korzhevsky D.E. Astrocytes and their participation in the mechanisms of therapeutic action of multipotent mesenchymal stromal cells in ischemic brain damage. *Geny i kletki*. 2019; 14 (1): 33–40 [In Russ.]. DOI: 10.23868/201903004
10. Pekny M., Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014; 94: 1077–1098. DOI: 10.1152/physrev.00041.2013
11. Cowan M., Petri Jr. W. A. Microglia: Immune regulators of neurodevelopment. *Frontiers in immunology*. 2018; 9: 2576. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02576
12. Chen Z., Zhong, D., Li, G. The role of microglia in viral encephalitis: a review. *Journal of Neuroinflammation*. 2019; 16: 76. DOI: 10.1186/s12974-019-1443-2
13. Sotnikov O.S., Frumkina L.E., Laktionova A.A., Paramonova N.M., Novakovskaya S.A. Binuclear neurons: syncytial fusion or amitosis. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2011; 42 (4): 76–89 [In Russ.]. PMID: 22145312
14. Sotnikov O.S., Frumkina L.E., Novakovskaya S.A., Bogolepov N.N. Fusion of brain neurons in rat embryos. *Morfologiya*. 2011; 139 (2): 18–21 [In Russ.]. PMID: 21866800

14. Сотников О.С., Фрумкина Л.Е., Новаковская С.А., Боголепов Н.Н. Слияние нейронов мозга у эмбрионов крыс. *Морфология*. 2011; 139 (2): 18–21. PMID: 21866800
15. Kemp K, Wilkins A, Scolding N. Cell fusion in the brain: two cells forward, one cell back. *Acta Neuropathol*. 2014; 128: 629–638. DOI: 10.1007/s00401-0141303-1
16. Pereira M, Birtele M, Rylander Ottosson D. Direct reprogramming into interneurons: potential for brain repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019; 76: 3953–3967. DOI: 10.1007/s00018-019-03193-3
17. Свиридкина Н.Б., Шакова Ф.М., Комиссарова С.В., Дубровин И.П., Турьгина С.А., Романова Г.А., Баранова В.М. Морфофункциональное исследование действия антиортогостатической гипокинезии при очаговом ишемическом повреждении коры головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 2: 22–26. PMID: 22708403
18. Криштон В.В., Никонорова В.Г., Румянцева Т.А. Изменения клеточного состава коры головного мозга у крыс с разным уровнем когнитивных функций при церебральной гипоперфузии. *Вестник Российского университета дружбы народов*. 2019; 8 (4): 22–29. DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-4-22-29
19. Paltyn A.A., Manukhina E.B., Goryacheva A.V., Downey H.F., Dubrovina I.P., Komissarova S.V., Kubatiev A.A. Intermittent hypoxia stimulates formation of binuclear neurons in brain cortex – A role of cell fusion in neuroprotection? *Experimental Biology and Medicine*. 2014; 239: 595–600. DOI: 10.1177/1535370214523898
20. Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. О регенерации мозга (лекция III). *Патогенез*. 2018; 16 (1): 83–91. DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.83-91
21. Моргун А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Кувачева Н.В., Панина Ю.А., Таранушенко Т.Е., Солончук Ю.Ю., Салмина А.Б. Структурная и функциональная гетерогенность астроцитов головного мозга: роль в нейродегенерации и нейровоспалении. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014; 13 (5): 138–148. DOI: 10.20538/1682-0363-2014-5-138-148
22. Sankavaram S.R., Svensson M.A., Olsson T, Brundin L, Johansson C.B. Cell fusion along the anterior-posterior neuroaxis in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2015; 10 (7): e0133903. DOI: 10.1371/journal.pone.0133903
23. Giordano-Santini R, Linton C, Hilliard M.A. Cell-cell fusion in the nervous system: Alternative mechanisms of development, injury, and repair. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2016; 60: 146–54. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.06.019
24. Kravtsov V, Oren-Suissa M, Podbilewicz B. The fusogen AFF-1 can rejuvenate the regenerative potential of adult dendritic trees by self-fusion. *Development*. 2017; 144 (13): 2364–74. DOI: 10.1242/dev.150037
25. Espejel S, Romero R, Alvarez-Buylla A. Radiation damage increases Purkinje neuron heterokaryons in neonatal cerebellum. *Ann. Neurol*. 2009; 66: 100–109. DOI: 10.1002/ana.21670
26. Kemp K, Gray E, Wilkins A, Scolding N. Purkinje cell fusion and binucleate heterokaryon formation in multiple sclerosis cerebellum. *Brain*. 2012; 135: 2962–2972. DOI: 10.1002/ana.21670
27. Юшков Б.Г. Клетки иммунной системы и регуляция регенерации. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 94–105. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-94-105
28. Ackman J.B., Siddiqi F, Walikonis R.S., LoTurco J.J. Fusion of microglia with pyramidal neurons after retroviral infection. *J. Neurosci*. 2006; 26: 11413–11422. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3340-06.2006
29. Сотников О.С. Ретикулярная теория Камилло Гольджи и перестройка электрических синапсов в синцитиальные перфорации. *Известия РАН. Серия биологическая*. 2019; 2: 127–143. DOI: 10.1134/S0002332919020140
30. Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов А.С., Горбунова А.В., Степанов С.С. Плейотропные ферменты апоптоза и синаптическая пластичность гиппокампа белых крыс после окклюзии общих сонных артерий. *Сибирский медицинский журнал (г. Томск)*. 2018; 33 (3): 102–110. DOI: 10.29001/2073-8552-2018-33-3-102-110
31. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. Изд-во Питер; 2003: 2-ое изд.: 688.
32. Giordano-Santinia R, Kaulicha E, Galbraith K.M., Ritchie F.K., Wang W, Lib Z, Hilliard M.A. Fusogen-mediated neuron-neuron fusion disrupts neural circuit connectivity and alters animal behavior. *PNAS*. 2020; 117 (37): 23054–23065. DOI: 10.1073/pnas.1919063117
33. Alvarez-Dolado M, Martinez-Losa M. Cell fusion and tissue regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2011; 713: 161–175. DOI: 10.1007/978-94-007-0763-4_10
34. Kosi N, Alić I, Kolačević M, Vrsaljko N, Jovanov Milošević N, Sobol M., Philimonenko A., Hozák P, Gajović S., Pochet R, Mitrečić D. Nop2 is expressed during proliferation of neural stem cells and in adult mouse and human brain. *Brain Res*. 2015; 1597: 65–76. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.11.040
35. Damisah E.C., Hill R.A., Rai A., Chen F, Ghosh S, Grutzendler J. Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal in vivo. *Science Advances*. 2020; 6 (26): eaba3239. DOI: 10.1126/sciadv.aba3239
36. Kemp K, Wilkins A, Scolding N. Cell fusion in the brain: two cells forward, one cell back. *Acta Neuropathol*. 2014; 128: 629–638. DOI: 10.1007/s00401-0141303-1
37. Pereira M, Birtele M, Rylander Ottosson D. Direct reprogramming into interneurons: potential for brain repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019; 76: 3953–3967. DOI: 10.1007/s00018-019-03193-3
38. Свиридкина Н.Б., Шакова Ф.М., Комиссарова С.В., Дубровин И.П., Турьгина С.А., Романова Г.А., Баранова В.М. Морфофункциональное исследование действия антиортогостатической гипокинезии при очаговом ишемическом повреждении коры головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 2: 22–26. PMID: 22708403
39. Криштон В.В., Никонорова В.Г., Румянцева Т.А. Изменения клеточного состава коры головного мозга у крыс с разным уровнем когнитивных функций при церебральной гипоперфузии. *Вестник Российского университета дружбы народов*. 2019; 8 (4): 22–29. DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-4-22-29
40. Paltyn A.A., Manukhina E.B., Goryacheva A.V., Downey H.F., Dubrovina I.P., Komissarova S.V., Kubatiev A.A. Intermittent hypoxia stimulates formation of binuclear neurons in brain cortex – A role of cell fusion in neuroprotection? *Experimental Biology and Medicine*. 2014; 239: 595–600. DOI: 10.1177/1535370214523898
41. Paltyn A.A., Sviridkina N.B. On brain regeneration (lecture II). *Patogenesis*. 2016 (1): 83–91 [In Russ.]. DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.83-91
42. Morgun A.V., Malinovskaya N.A., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Kuvacheva N.V., Panina Yu.A., Taranushenko T.E., Solonchuk R.Yu., Salmina A.B. Structural and functional heterogeneity of brain astrocytes: the role in neurodegeneration and neuroinflammation. *Byulleten' sibirskoj meditsiny*. 2014; 13 (5): 138–148 [In Russ.]. DOI: 10.20538/1682-0363-2014-5-138-148
43. Sankavaram S.R., Svensson M.A., Olsson T, Brundin L, Johansson C.B. Cell fusion along the anterior-posterior neuroaxis in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2015; 10 (7): e0133903. DOI: 10.1371/journal.pone.0133903
44. Giordano-Santini R, Linton C, Hilliard M.A. Cell-cell fusion in the nervous system: Alternative mechanisms of development, injury, and repair. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2016; 60: 146–54. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.06.019
45. Kravtsov V, Oren-Suissa M, Podbilewicz B. The fusogen AFF-1 can rejuvenate the regenerative potential of adult dendritic trees by self-fusion. *Development*. 2017; 144 (13): 2364–74. DOI: 10.1242/dev.150037
46. Espejel S, Romero R, Alvarez-Buylla A. Radiation damage increases Purkinje neuron heterokaryons in neonatal cerebellum. *Ann. Neurol*. 2009; 66: 100–109. DOI: 10.1002/ana.21670
47. Kemp K, Gray E, Wilkins A, Scolding N. Purkinje cell fusion and binucleate heterokaryon formation in multiple sclerosis cerebellum. *Brain*. 2012; 135: 2962–2972. DOI: 10.1002/ana.21670
48. Юшков Б.Г. Клетки иммунной системы и регуляция регенерации. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 94–105. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-94-105
49. Ackman J.B., Siddiqi F, Walikonis R.S., LoTurco J.J. Fusion of microglia with pyramidal neurons after retroviral infection. *J. Neurosci*. 2006; 26: 11413–11422. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3340-06.2006
50. Сотников О.С. Ретикулярная теория Камилло Гольджи и перестройка электрических синапсов в синцитиальные перфорации. *Известия РАН. Серия биологическая*. 2019; 2: 127–143. DOI: 10.1134/S0002332919020140
51. Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов А.С., Горбунова А.В., Степанов С.С. Плейотропные ферменты апоптоза и синаптическая пластичность гиппокампа белых крыс после окклюзии общих сонных артерий. *Сибирский медицинский журнал (г. Томск)*. 2018; 33 (3): 102–110. DOI: 10.29001/2073-8552-2018-33-3-102-110
52. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. Изд-во Питер; 2003: 2-ое изд.: 688.
53. Giordano-Santinia R, Kaulicha E, Galbraith K.M., Ritchie F.K., Wang W, Lib Z, Hilliard M.A. Fusogen-mediated neuron-neuron fusion disrupts neural circuit connectivity and alters animal behavior. *PNAS*. 2020; 117 (37): 23054–23065. DOI: 10.1073/pnas.1919063117
54. Alvarez-Dolado M, Martinez-Losa M. Cell fusion and tissue regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2011; 713: 161–175. DOI: 10.1007/978-94-007-0763-4_10
55. Kosi N, Alić I, Kolačević M, Vrsaljko N, Jovanov Milošević N, Sobol M., Philimonenko A., Hozák P, Gajović S., Pochet R, Mitrečić D. Nop2 is expressed during proliferation of neural stem cells and in adult mouse and human brain. *Brain Res*. 2015; 1597: 65–76. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.11.040
56. Damisah E.C., Hill R.A., Rai A., Chen F, Ghosh S, Grutzendler J. Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal in vivo. *Science Advances*. 2020; 6 (26): eaba3239. DOI: 10.1126/sciadv.aba3239

Received 06.01.21

Поступила 06.01.21