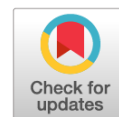


УДК 616-091.8

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ352521>

NeuN-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ НЕЙРОНЫ В СУБФОРНИКАЛЬНОМ ОРГАНЕ У КРЫС ЛИНИИ SHR

В.А. Разенкова

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Разенкова В.А. NeuN-иммунопозитивные нейроны в субфорникальном органе у крыс линии SHR // Медицинский академический журнал. 2023. Т. 23. № 2. С. 101–108. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ352521>

Рукопись получена: 26.04.2023

Рукопись одобрена: 12.06.2023

Опубликована: 30.06.2023

Обоснование. Артериальная гипертензия — один из основных факторов риска развития ряда заболеваний сердечно-сосудистой и нервной систем. Особого внимания заслуживает исследование влияния стойкого повышения артериального давления на лишенные гематоэнцефалического барьера циркумвентрикулярные органы центральной нервной системы (к которым относится и субфорникальный орган), обеспечивающие ее реакцию на стресс или повреждение.

Цель — изучить расположение и функциональное состояние нейронов субфорникального органа спонтанно-гипертензивных крыс линии SHR.

Материалы и методы. Исследование проводили на парафиновых срезах головного мозга спонтанно-гипертензивных крыс линии SHR и крыс породы Вистар ($n = 12$). Для светоптического исследования использовали мышиные моноклональные антитела к NeuN. Для анализа изображений применяли программу Fiji.

Результаты. В результате исследования продемонстрировано, что пространственное распределение нейронов субфорникального органа крыс Вистар и SHR различно. На срезах головного мозга крыс Вистар отмечали компактную локализацию NeuN-положительных клеток. В противоположность этому, для нейронов субфорникального органа крыс SHR характерно формирование обособленных групп, что дополнительно подтверждено кластерным анализом. Между группами нейронов часто располагались пустоты, которые при подкраске гистологическими красителями идентифицированы как скопления глиальных клеток.

Заключение. Проведенное исследование показало, что нейроны субфорникального органа крыс SHR могут подвергаться реорганизации, которая, по-видимому, обусловлена гибелью части нервных клеток и глиозом.

Ключевые слова: артериальная гипертензия; субфорникальный орган; спонтанно-гипертензивные крысы; иммуногистохимия.

NeuN-IMMUNOPOSITIVE CELLS IN SUBFORNICAL ORGAN OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

V.A. Razenkova

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Razenkova VA. NeuN-immunopositive cells in subfornical organ of spontaneously hypertensive rats. *Medical Academic Journal*. 2023;23(2):101–108. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ352521>

Received: 26.04.2023

Accepted: 12.06.2023

Published: 30.06.2023

BACKGROUND: Hypertension is one of the predominant risk factors for the development of several cardiovascular and central nervous system diseases. It is important to investigate the hypertensive effects on the tissue of brain areas, lacking blood-brain barrier, such as the subfornical organ, as they provide the CNS response to stress and damage.

AIM: The aim of the research was to study the localization and functional status of the neuronal cell population within the subfornical organ of Spontaneously Hypertensive Rats.

MATERIALS AND METHODS: The study was carried out on paraffin sections of the brain of Spontaneously Hypertensive Rats and Wistar rats ($n = 12$). Mouse monoclonal antibodies against NeuN were used for the light microscopy. Images were analyzed by the Fiji software.

RESULTS: It was demonstrated that the spatial neuron distribution of the subfornical organ of Wistar and SHR rats is different. NeuN-positive cells of the subfornical organ of Wistar rats demonstrated dense distribution. On the contrary, subfornical organ neurons of SHRs tended to form separate groups. That observation was additionally confirmed by cluster analysis. Between the groups of NeuN-positive cells. Histochemical counterstain revealed that the “gaps” between neuronal groups are composed of glial cells.

CONCLUSIONS: The study showed neurons in the subfornical organ of spontaneously hypertensive rats may undergo reorganization, which is, apparently, caused by the neuronal cell death and gliosis.

Keywords: hypertension; subfornical organ; spontaneously hypertensive rats; immunohistochemistry.

Список сокращений

СФО — субфорникальный орган; АПФ2 — ангиотензинпревращающий фермент 2.

Обоснование

Субфornикальный орган (СФО) — один из циркумвентрикулярных органов центральной нервной системы, располагающихся на границе с желудочковой системой головного мозга [1], регулятор электролитного состава крови, что делает его одним из ключевых «игроков», обеспечивающих поддержание энергетического и водно-солевого баланса организма [2, 3]. Интерес исследователей к изучению структуры и клеточного состава СФО определяется отсутствием в этой области классического гематоэнцефалического барьера, вследствие чего составляющие орган ткани и клетки оказываются наиболее чувствительными к воздействию гуморальных факторов крови [4], поэтому колебания концентрации биологически активных веществ в периферической крови, присутствие в ней патогенов или общее нарушение кровообращения могут приводить к изменениям, в том числе деструктивным, нервной ткани СФО. Так, продемонстрировано, что циркулирующие в крови эндотоксины (такие как липополисахарид) стимулируют воспалительную реакцию и истощение пула макрофагов СФО [5], а недавние исследования показали возможную вовлеченность СФО в распространение и протекание коронавирусной инфекции, благодаря связыванию вирусов HCoV-NL63, SARS-CoV и SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ2), экспрессированным на поверхности нейронов СФО [6]. Однако данные, характеризующие состояние клеточных популяций СФО при различных патологических состояниях, а также под влиянием разнообразных биологически активных факторов, нуждаются в существенном расширении. Таким образом, исследование реакции клеточных элементов СФО на стресс и другие патологические стимулы можно считать перспективным направлением в отношении понимания патогенеза заболеваний, связанных с нарушением функций центральной нервной системы. Особого внимания в этом отношении заслуживает артериальная гипертензия как один из факторов риска нарушения мозгового кровообращения и инсульта, а также развития прогрессирующих заболеваний нервной системы [7, 8]. В связи с этим изучение реакции нейрональной популяции СФО на стойкое повышение артериального давления представляется актуальной научной задачей.

В качестве экспериментальной модели артериальной гипертензии широкое распространение получила линия крыс SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) [9, 10]. Артериальная гипертензия у крыс этой линии генетически детерминирована и связана с нарушением функции

нескольких генов, участвующих в регуляции артериального давления [11].

Один из надежных доказательных подходов, применяемых для оценки функционального состояния нейронов, — иммуногистохимическое исследование с использованием антител к ядерному белку нервных клеток NeuN [12]. Анализ локализации NeuN широко применяется в сравнительных физиологических и молекулярно-биологических исследованиях для определения степени повреждения головного мозга при моделировании экспериментальной патологии [13, 14], реакции нейронов на воздействие токсических веществ [15] или механическое повреждение нервной ткани [16]. Таким образом, NeuN представляется надежным маркером, характеризующим состояние нейронов различных формаций головного мозга при развитии артериальной гипертензии.

Целью данного исследования стал морфологический и иммуногистохимический анализ распределения нейронов СФО у крыс в норме и у крыс SHR с выявлением белка NeuN.

Материалы и методы

Для оценки функционального состояния нейронов СФО крыс исследовали парафиновые срезы головного мозга спонтанно-гипертензивных крыс-самцов линии SHR ($n = 5$). В качестве контроля использовали срезы головного мозга нормотензивных крыс-самцов породы Вистар ($n = 7$). Животные были получены из биобанка Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Для верификации артериальной гипертензии у крыс линии SHR использовали систему неинвазивного измерения давления NIBP200A (Biopac Systems, Inc., США). Для исследования отбирали животных с систолическим давлением, в среднем соответствующим или превышающим 200 мм рт. ст. (см. таблицу). При содержании и умерщвлении животных соблюдали основные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986) и «Правила надлежащей лабораторной практики» (приказ № 199н от 01.04.2016 Минздрава России). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (заключение № 1/22 от 18.02.2022). Материал фиксировали в цинк-этанол-формалине [17] и заливали в парафин по стандартной методике. Из парафиновых блоков на ротационном микротоме Leica RM 2125RT на уровне СФО изготавливали срезы толщиной 5 мкм и монтировали на стекла с адгезивным покрытием HistoBond® (Paul Marienfeld, Германия).

После депарафинирования и регидратации препаратов проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере (S1700, Agilent, США) в течение 22 мин. Ингибирование эндогенной пероксидазы проводили путем обработки срезов 3 % водным раствором перекиси водорода, а блокирование неспецифических сайтов связывания антигена — блокировочным раствором (Protein Block, Spring Bioscience, США) в течение 10 мин. Для постановки иммуногистохимической реакции использовали мышинные моноклональные (клон A60) антитела против NeuN в разведении 1 : 500 (MAB377, Merck, США). В качестве вторичных реагентов использовали набор UltraVision Quanto HRP DAB Detection System (TL-060-QHL, Thermo Fisher Scientific, США). Для предотвращения перекрестного связывания вторичных реагентов с собственными иммуноглобулинами крысы в раствор вторичных антител добавляли сыворотку, полученную из крови крыс породы Вистар, содержащихся в виварии ФГБНУ «ИЭМ», до конечной концентрации раствора 0,5 %. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3,3'-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). После процедуры иммуногистохимического окрашивания часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином либо альциановым синим. Полученные препараты анализировали с использованием микроскопа Leica DM750 (Германия) и фотографировали с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

Для оценки распределения популяций нервных клеток на препаратах головного мозга применяли кластерный анализ. Для этого полученные микрофотографии подвергали цифровому преобразованию с использованием плагина SSIDC Cluster Indicator из комплекта BioVoxel Toolbox для Fiji [18], на основе алгоритма DBSCAN. Параметр $\epsilon = 20$ пикселей (минимальное расстояние между объектами для создания общего кластера), $\text{minDensity} = 3$ объекта (минимальная плотность пикселей для создания одного кластера).

Результаты

Результаты измерения артериального давления у крыс линии SHR, отобранных для проведения настоящего исследования, представлены в таблице.

Предварительное изучение гистологических микропрепаратов при окрашивании ткани гематоксилином или альциановым синим показало, что СФО крыс (как Вистар, так и SHR) имеет форму небольшого бугорка, вдающегося в просвет третьего желудочка. СФО характеризуется высокой клеточной плотностью и небольшим содержанием нейропиля. В латеральных и дорсолатеральных частях СФО расположены крупные тонкостенные сосуды. Сосуды микроциркуляторного русла в этой области головного мозга отличаются расширенными периваскулярными пространствами, что отчетливо проявляется при окраске препаратов альциановым синим.

В результате иммуногистохимической реакции на срезах головного мозга всех исследуемых животных хорошо визуализируются нейроны СФО (рис. 1). СФО характеризуется высокой клеточной плотностью как за счет присутствия большого количества нейронов, выявляемых высокоинтенсивной реакцией на NeuN, так и за счет глиальных элементов, ядра которых позволила выявить подкраска препаратов гистологическими красителями. Нейроны СФО крыс Вистар локализованы компактно, распределены относительно равномерно в пределах органа. Выявляются клетки как с интенсивной, так и со слабой реакцией на NeuN. При этом общая интенсивность иммуногистохимической реакции в СФО визуальна ниже, чем в прилежащих корковых и стриатных регионах. Глиальный компонент СФО кажется немногочисленным по сравнению с нейральным. В каудальной области СФО плотность нейронов значительно снижается, наблюдается преобладание глиального компонента над нейральным.

При изучении гистологических микропрепаратов СФО спонтанно-гипертензивных крыс было отмечено визуальное сокращение популяции

Таблица / Table

Систолическое давление у крыс линии SHR
The systolic pressure of SHR

№ крысы	Систолическое давление, мм рт. ст.			
	первое измерение	второе измерение	третье измерение	среднее арифметическое
1	208	210	209	209
2	220	200	194	205
3	220	220	207	216
4	184	220	220	208
5	220	220	202	214

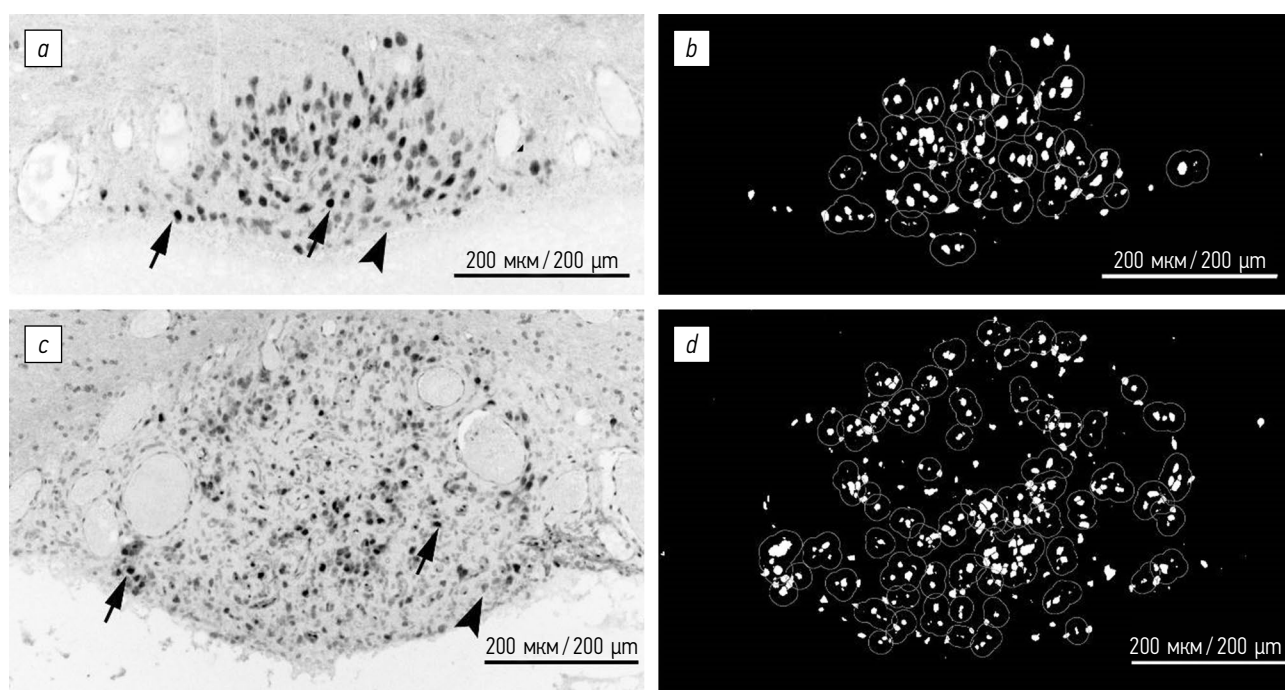


Рис. 1. NeuN в субфорникальном органе крыс: *a* — Вистар, *c* — SHR. Иммуногистохимическая реакция на NeuN с подкраской альциановым синим. Микрофотографии субфорникального органа крыс Вистар (*b*) и SHR (*d*), преобразованные методом кластеризации по плотности (алгоритм DBSCAN) при ϵ -окрестности 20 пикселей и минимальной плотности частиц 3. Стрелки указывают на нейроны с интенсивной окраской, головки стрелок — клетки с окраской средней интенсивности. Границы территорий (серый цвет) ограничивают предполагаемые кластеры

Fig. 1. NeuN distribution in the rats SFO: *a* — Wistar, *c* — SHR. Immunohistochemical staining of neurons (NeuN) with alcian blue counterstain. Micrographs of the Wistar rat (*b*) and SHR (*d*) subformal organ, transformed using by the density based clustering DBSCAN algorithm. Parameter's value $\epsilon = 20$ pixels, minDensity = 3 objects. Arrows indicate intensively stained neurons, arrowheads show neurons with average IHC intensity. Borders (gray) indicate estimated clusters

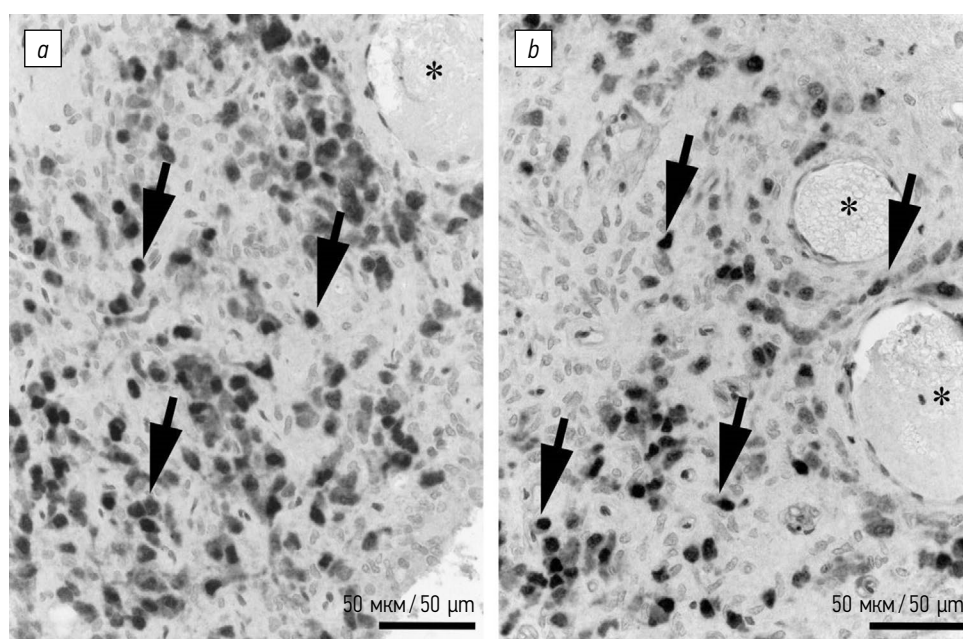


Рис. 2. Особенности распределения NeuN в субфорникальном органе крыс при развитии артериальной гипертензии. Иммуногистохимическая реакция на NeuN с подкраской гематоксилином, крыса Вистар (*a*), с подкраской альциановым синим, крыса SHR (*b*). Стрелки указывают на NeuN-содержащие клетки, звездочки — кровеносные сосуды

Fig. 2. Hypertension-induced NeuN distribution in subformal organ. NeuN immunohistochemistry with hematoxylin counterstain, Wistar rat (*a*), with alcian blue counterstain, SHR (*b*). Arrows indicate NeuN-immunopositive cells, arrows — blood vessels

нейронов. Нейроны в паренхиме СФО у крыс SHR располагаются неравномерно и разделены глиальными элементами таким образом, что на срезах можно выявить обособленные скопления NeuN-позитивных клеток. Неравномерная интенсивность иммуногистохимической реакции в пределах органа и пониженная ее интенсивность по сравнению с другими наблюдаемыми на срезе областями головного мозга также отмечена у крыс SHR. В каудальной области, как и у крыс Вистар, плотность нейронов визуальным образом снижена. Все выявляемые NeuN-клетки СФО в этой области имели окраску слабой интенсивности. Скопления NeuN-содержащих клеток чаще всего отмечали в центральной части органа, вблизи крупных кровеносных сосудов, а также по периферии СФО — в субependимной зоне и на границе с прилежащим белым веществом (рис. 2, *b*). Оценка распределения NeuN-содержащих клеток с использованием плагина SSIDC Cluster Indicator подтвердила как наличие кластеров в пределах СФО, так и их расположение в основном в центральной и вентральной частях СФО (рис. 1, *c, d*). Между кластерами часто располагались пустоты, которые при исследовании препаратов при большом увеличении идентифицировали как скопления глиальных клеток.

Обсуждение результатов

Результаты исследования позволили охарактеризовать распределение нервных клеток в СФО крыс с нормальным и повышенным артериальным давлением.

Так, в ростральной и медиальной областях СФО крыс Вистар была отмечена высокая плотность нейронов, гомогенно распределенных в паренхиме органа. И напротив, в каудальной области СФО наблюдается малое количество NeuN-иммунопозитивных клеток. В этой области СФО прилегает и прикрепляется к сосудистому сплетению головного мозга [19] так, что основными структурными элементами здесь выступают многочисленные отростки нервных и глиальных клеток [20].

Интересной особенностью становится неравномерная интенсивность NeuN-иммунореактивности в клетках СФО. При обращении внимания на предполагаемые функции белка NeuN разными группами исследователей было замечено преимущественное его расположение в областях эухроматина. Дальнейшие исследования показали не только принадлежность NeuN к семейству Fox-1 факторов сплайсинга, но и его четкую колокализацию с белками маркерами ядерных спеклов [21, 22]. Таким образом, наблюдаемая на препаратах высокоинтенсивная

иммуногистохимическая реакция на NeuN может указывать на особое функциональное состояние нейрона, связанное с регуляцией транскрипции и сплайсинга. Тем не менее при использовании только лишь иммуногистохимических подходов установить корреляцию между интенсивностью реакции на NeuN в нервных клетках и процессами экспрессии генов, к сожалению, не представляется возможным.

Иная пространственная организация нейронов СФО наблюдалась у спонтанно-гипертензивных крыс линии SHR. В росто-медиальном отделе СФО отмечали значительную потерю NeuN-иммунопозитивных клеток и формирование обособленных групп нейронов. Для проверки предположения о формировании нейронами СФО крыс SHR обособленных клеточных скоплений была проведена оценка распределения иммунопозитивных клеток с использованием кластерного анализа. Для этого использовали плагин SSIDC Cluster Indicator из комплекта BioVoxel Toolbox для Fiji, основанный на алгоритме DBSCAN, который определяет области концентрации точек, отделяя их от пустых и разреженных областей [23]. В результате цифрового преобразования изображений при заданных параметрах нам удалось подтвердить как компактное расположение нейронов СФО крыс Вистар, так и разреженную локализацию NeuN-положительных клеток крыс SHR и формирование ими в пределах СФО дискретных скоплений. Таким образом, результаты иммуногистохимического исследования дополнительно подтверждаются кластерным анализом.

Обнаруженная неравномерность распределения NeuN-содержащих элементов в СФО крыс SHR заставляет искать причины формирования подобных морфологических особенностей. Определенную реакцию нейрональной популяции СФО в ответ на стойкое повышение артериального давления следует ожидать, принимая во внимание тесную связь развития гипертонии с дисфункцией ренин-ангиотензиновой системы [24, 25]. Контроль артериального давления в нервной системе осуществляется воздействием ангиотензина II на нейроны через рецепторы ангиотензина II типов 1 и 2 (AT1R, AT2R) [26]. Постоянная активация AT1R, присутствующего на плазматических мембранах нейронов СФО, в свою очередь приводит к усилению секреции вазопрессина, нарушению чувствительности барорефлекса и способствует поддержанию состояния воспаления, связанного с повышенным артериальным давлением, что дополнительно приводит к повреждению тканей и дисфункции органов [27]. В этом контексте представляется важным упомянуть, что вазоконстрикторные эффекты ангиотензина II подавляются

с помощью сигнального пути АПФ2 – ангиотензин 1-7 – Mas-рецептор. Это позволяет рассматривать агонисты АПФ2 в качестве потенциальных фармакологических агентов для лечения гипертонии [28], а особенности проницаемости гематоэнцефалического барьера в СФО, клетки которого содержат на мембранах АПФ2, делают его одной из возможных областей проникновения лекарственных препаратов в головной мозг. Еще один важный факт, касающийся АПФ2, — это то, что при инфицировании SARS-CoV-2 этот рецептор обеспечивает проникновение вируса в клетки-мишени. Связывание SARS-CoV-2 с АПФ2, как предполагается, вызывает нарушение сигнального пути АПФ2 – ангиотензин 1-7 – Mas-рецептор, накопление ангиотензина II и дисфункцию ренин-ангиотензиновой системы [6]. Это может говорить о том, что COVID-19 может не только усугублять течение артериальной гипертензии, но и оказаться одним из факторов риска развития болезни.

Однако стоит отдельно отметить, что, несмотря на распространенное применение иммуногистохимической реакции на NeuN при проведении научных исследований и диагностики патологий [12], снижение интенсивности или полное отсутствие реакции не может трактоваться однозначно. В работах по исследованию реакции нейронов на повреждение продемонстрировано, что утрата NeuN-положительных клеток может быть связана не только с прогнозируемой или произошедшей клеточной гибелью [29], но и с транзитным прекращением синтеза этого белка в клетке при сохранении нейронами жизнеспособности [30]. Последнее предположение не кажется убедительным для рассматриваемого случая, поскольку подкраска ядер клеток не выявляет типичных NeuN-негативных нейронов в изученном материале.

Общеизвестен факт наличия у спонтанно-гипертензивных крыс линии SHR проявлений нейродегенерации в виде некроза нервных клеток с пролиферацией глиальных элементов в очагах опустошения в корковых структурах [31, 32]. В связи с этим более вероятным представляется гибель нейронов в СФО крыс SHR, вариант которой (запуск различных механизмов, каскадов) в рамках настоящего исследования установить невозможно.

Закключение

1. Иммуногистохимический метод в сочетании с применением кластерного анализа позволил получить детальную информацию о локализации и морфологии клеток, а также о плотности их распределения в тканевых структурах.
2. Проведенное исследование показало, что нейрональная популяция СФО у крыс SHR

подвергается реорганизации и, возможно, дегенерации.

3. Изменение распределения белка NeuN в пределах нейрональной популяции СФО у крыс SHR, по-видимому, обусловлено гибелью клеток, механизм которой в рамках настоящего исследования установить невозможно.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Вклад автора. Автор внес существенный вклад в разработку концепции и подготовку статьи, прочел и одобрил финальную версию перед публикацией.

Additional information

Funding source. The reported study was funded by RSF according to the research project No. 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>.

Conflict of interest. The author declare that they have no conflict of interest.

Authors contribution. The author made a significant contribution to the development of the concept and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Список литературы

1. McKinley M.J., Clarke I.J., Oldfield B.J. Circumventricular organs // Mai J.K., Paxinos G., eds. The human nervous system: second edition. San Diego: Academic Press, 2004. P. 562–591. DOI: 10.1016/B978-012547626-3/50020-X
2. Pulman K.J., Fry W.M., Cottrell G.T., Ferguson A.V. The subfornical organ: a central target for circulating feeding signals // J. Neurosci. 2006. Vol. 26, No. 7. P. 2022–2030. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3218-05.2006
3. Zimmerman C.A., Huey E.L., Ahn J.S. et al. A gut-to-brain signal of fluid osmolarity controls thirst satiation // Nature. 2019. Vol. 568, No. 7750. P. 98–102. DOI: 10.1038/s41586-019-1066-x
4. Jeong J.K., Dow S.A., Young C.N. Sensory circumventricular organs, neuroendocrine control, and metabolic regulation // Metabolites. 2021. Vol. 11, No. 8. P. 1–16. DOI: 10.3390/metabo11080494
5. Morita-Takemura S., Nakahara K., Hasegawa-Ishii S. et al. Responses of perivascular macrophages to circulating lipopolysaccharides in the subfornical organ with special reference to endotoxin tolerance // J. Neuroinflammation. 2019. Vol. 16, No. 1. P. 39. DOI: 10.1186/s12974-019-1431-6
6. Ong W.Y., Satish R.L., Herr D.R. ACE2, circumventricular organs and the hypothalamus, and COVID-19 // Neuromolecular Med. 2022. Vol. 24, No. 4. P. 363–373. DOI: 10.1007/S12017-022-08706-1
7. Canavan M., O'Donnell M.J. Hypertension and cognitive impairment: a review of mechanisms and key concepts // Front. Neurol. 2022. Vol. 13. P. 821135. DOI: 10.3389/FNEUR.2022.821135

8. Youwakim J., Girouard H. Inflammation: a mediator between hypertension and neurodegenerative diseases // *Am. J. Hypertens.* 2021. Vol. 34, No. 10. P. 1014–1030. DOI: 10.1093/AJH/HPAB094
9. Кирик О.В., Цыба Д.Л., Алексеева О.С. и др. Изменения клеток Колмера у крыс линии SHR после ишемии головного мозга // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2021. Т. 107, № 2. С. 177–186. DOI: 10.31857/S0869813921010052
10. Caniffi C., Prentki Santos E., Cerniello F.M. et al. Cardiac morphological and functional changes induced by C-type natriuretic peptide are different in normotensive and spontaneously hypertensive rats // *J. Hypertens.* 2020. Vol. 38, No. 11. P. 2305–2317. DOI: 10.1097/HJH.0000000000002570
11. Arata Y., Geshi E., Nomizo A. et al. Alterations in sarcoplasmic reticulum and angiotensin II receptor type 1 gene expression in spontaneously hypertensive rat hearts // *Jpn. Circ. J.* 1999. Vol. 63, No. 5. P. 367–372. DOI: 10.1253/jcj.63.367
12. Gusel'nikova V.V., Korzhevskiy D.E. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker // *Acta Naturae.* 2015. Vol. 7, No. 2. P. 42–47. DOI: 10.32607/20758251-2015-7-2-42-47
13. Bendel O., Alkass K., Bueters T. et al. Reproducible loss of CA1 neurons following carotid artery occlusion combined with halothane-induced hypotension // *Brain Res.* 2005. Vol. 1033, No. 2. P. 135–142. DOI: 10.1016/J.BRAINRES.2004.11.033
14. Qiao L., Fu J., Xue X. et al. Neuronal injury and roles of apoptosis and autophagy in a neonatal rat model of hypoxia-ischemia-induced periventricular leukomalacia // *Mol. Med. Rep.* 2018. Vol. 17, No. 4. P. 5940–5949. DOI: 10.3892/MMR.2018.8570
15. Du J., Liu J., Huang X. et al. Catalpol ameliorates neurotoxicity in N2a/APP695swe cells and APP/PS1 transgenic mice // *Neurotox. Res.* 2022. Vol. 40, No. 4. P. 961–972. DOI: 10.1007/S12640-022-00524-4
16. Xu X., Gao W., Cheng S. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury // *J. Neuroinflammation.* 2017. Vol. 14, No. 1. P. 167. DOI: 10.1186/S12974-017-0934-2
17. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanolformaldehyde // *Eur. J. Histochem.* 2015. Vol. 59, No. 3. P. 2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530
18. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods.* 2012. Vol. 9, No. 7. P. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019
19. Greiner T., Manzhuza K., Baumann L. et al. Morphology of the murine choroid plexus: Attachment regions and spatial relation to the subarachnoid space // *Front. Neuroanat.* 2022. Vol. 16. P. 1046017. DOI: 10.3389/FNANA.2022.1046017/BIBTEX
20. Hicks A.I., Kobrinsky S., Zhou S. et al. Anatomical organization of the rat subfornical organ // *Front. Cell. Neurosci.* 2021. Vol. 15. P. 691711. DOI: 10.3389/FNCEL.2021.691711
21. Dent M.A.R., Segura-Anaya E., Alva-Medina J., Aranda-Anzaldo A. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix // *FEBS Lett.* 2010. Vol. 584, No. 13. P. 2767–2771. DOI: 10.1016/J.FEBSLET.2010.04.073
22. Duan W., Zhang Y.P., Hou Z. et al. Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator // *Mol. Neurobiol.* 2016. Vol. 53, No. 3. P. 1637–1647. DOI: 10.1007/S12035-015-9122-5
23. Ester M., Kriegel H-P., Sander J., Xu X. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining; 1996 Aug 2–4; Portland, US. Menlo Park: AAAI Press, 1996. P. 226–231.
24. Crowley S.D., Gurley S.B., Herrera M.J. et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103, No. 47. P. 17985–17990. DOI: 10.1073/PNAS.0605545103
25. Bajwa E., Klegeris A. Neuroinflammation as a mechanism linking hypertension with the increased risk of Alzheimer's disease // *Neural. Regen. Res.* 2022. Vol. 17, No. 11. P. 2342–2346. DOI: 10.4103/1673-5374.336869
26. Summers C., Alleyne A., Rodríguez V. et al. Brain angiotensin type-1 and type-2 receptors: cellular locations under normal and hypertensive conditions // *Hypertens. Res.* 2020. Vol. 43, No. 4. P. 281–295. DOI: 10.1038/S41440-019-0374-8
27. Mowry F.E., Biancardi V.C. Neuroinflammation in hypertension: the renin-angiotensin system versus pro-resolution pathways // *Pharmacol. Res.* 2019. Vol. 144. P. 279–291. DOI: 10.1016/J.PHRS.2019.04.029
28. Liao W., Wu J. The ACE2/Ang (1–7)/MasR axis as an emerging target for antihypertensive peptides // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2021. Vol. 61, No. 15. P. 2572–2586. DOI: 10.1080/10408398.2020.1781049
29. Collombet J.M., Masqueliez C., Four E. et al. Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus // *Neurosci. Lett.* 2006. Vol. 398, No. 3. P. 337–342. DOI: 10.1016/J.NEULET.2006.01.029
30. Ogino Y., Bernas T., Greer J.E., Povlishock J.T. Axonal injury following mild traumatic brain injury is exacerbated by repetitive insult and is linked to the delayed attenuation of NeuN expression without concomitant neuronal death in the mouse // *Brain Pathol.* 2022. Vol. 32, No. 2. P. e13034. DOI: 10.1111/BPA.13034
31. Tagami M., Nara Y., Kubota A. et al. Ultrastructural changes in cerebral pericytes and astrocytes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats // *Stroke.* 1990. Vol. 21, No. 7. P. 1064–1071. DOI: 10.1161/01.STR.21.7.1064
32. Айдарова В.С., Наумова О.В., Кудокоцева О.В. и др. Структура мозга крыс линии SHR с генетически детерминированной артериальной гипертензией // *Мир медицины и биологии.* 2018. Т. 14, № 2. С. 115–119. DOI: 10.26724/2079-8334-2018-2-64-115-119

References

1. McKinley MJ, Clarke IJ, Oldfield BJ. Circumventricular Organs. In: Mai J.K., Paxinos G., eds. *The human nervous system: second edition.* San Diego: Academic Press; 2004. P. 562–591. DOI: 10.1016/B978-012547626-3/50020-X
2. Pulman KJ, Fry WM, Cottrell GT, Ferguson AV. The subfornical organ: a central target for circulating feeding signals. *J Neurosci.* 2006;26(7):2022–2030. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3218-05.2006
3. Zimmerman CA, Huey EL, Ahn JS, et al. A gut-to-brain signal of fluid osmolarity controls thirst satiation. *Nature.* 2019;568(7750):98–102. DOI: 10.1038/s41586-019-1066-x
4. Jeong JK, Dow SA, Young CN. Sensory circumventricular organs, neuroendocrine control, and metabolic regulation. *Metabolites.* 2021;11(8):494. DOI: 10.3390/metabo11080494
5. Morita-Takemura S, Nakahara K, Hasegawa-Ishii S, et al. Responses of perivascular macrophages to circulating lipopolysaccharides in the subfornical organ with special reference to endotoxin tolerance. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):39. DOI: 10.1186/s12974-019-1431-6
6. Ong WY, Satish RL, Herr DR. ACE2, circumventricular organs and the hypothalamus, and COVID-19. *Neuromolecular Med.* 2022;24(4):363–373. DOI: 10.1007/S12017-022-08706-1

7. Canavan M, O'Donnell MJ. Hypertension and cognitive impairment: a review of mechanisms and key concepts. *Front Neurol*. 2022;13:821135. DOI: 10.3389/FNEUR.2022.821135
8. Youwakim J, Girouard H. Inflammation: a mediator between hypertension and neurodegenerative diseases. *Am J Hypertens*. 2021;34(10):1014–1030. DOI: 10.1093/AJH/HPAB094
9. Kirik OV, Tsyba DL, Alekseeva OS, et al. Alterations in Kolmer cells in SHR line rats after brain ischemia. *Russian Journal of Physiology*. 2021;107(2):177–186. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0869813921010052
10. Caniffi C, Prentki Santos E, Cerniello FM, et al. Cardiac morphological and functional changes induced by C-type natriuretic peptide are different in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2020;38(11):2305–2317. DOI: 10.1097/HJH.0000000000002570
11. Arata Y, Geshi E, Nomizo A, et al. Alterations in sarcoplasmic reticulum and angiotensin II receptor type 1 gene expression in spontaneously hypertensive rat hearts. *Jpn Circ J*. 1999;63(5):367–372. DOI: 10.1253/jcj.63.367
12. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*. 2015;7(2):42–47. DOI: 10.32607/20758251-2015-7-2-42-47
13. Bendel O, Alkass K, Bueters T, et al. Reproducible loss of CA1 neurons following carotid artery occlusion combined with halothane-induced hypotension. *Brain Res*. 2005;1033(2):135–142. DOI: 10.1016/J.BRAINRES.2004.11.033
14. Qiao L, Fu J, Xue X, et al. Neuronal injury and roles of apoptosis and autophagy in a neonatal rat model of hypoxia-ischemia-induced periventricular leukomalacia. *Mol Med Rep*. 2018;17(4):5940–5949. DOI: 10.3892/MMR.2018.8570
15. Du J, Liu J, Huang X, et al. Catalpol ameliorates neurotoxicity in N2a/APP695swe cells and APP/PS1 transgenic mice. *Neurotox Res*. 2022;40(4):961–972. DOI: 10.1007/S12640-022-00524-4
16. Xu X, Gao W, Cheng S, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):167. DOI: 10.1186/S12974-017-0934-2
17. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem*. 2015;59(3):2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530
18. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019
19. Greiner T, Manzula K, Baumann L, et al. Morphology of the murine choroid plexus: Attachment regions and spatial relation to the subarachnoid space. *Front Neuroanat*. 2022;16:1046017. DOI: 10.3389/FNANA.2022.1046017/BIBTEX
20. Hicks AI, Kobrinsky S, Zhou S, et al. Anatomical organization of the rat subfornical organ. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:691711. DOI: 10.3389/FNCEL.2021.691711
21. Dent MA, Segura-Anaya E, Alva-Medina J, Aranda-Anzaldo A. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett*. 2010;584(13):2767–2771. DOI: 10.1016/J.FEBSLET.2010.04.073
22. Duan W, Zhang YP, Hou Z, et al. Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):1637–1647. DOI: 10.1007/S12035-015-9122-5
23. Ester M, Kriegel H-P, Sander J, Xu X. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining; 1996 Aug 2-4; Portland, US. Menlo Park: AAAI Press, 1996. P. 226–231.
24. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(47):17985–17990. DOI: 10.1073/PNAS.0605545103
25. Bajwa E, Klegeris A. Neuroinflammation as a mechanism linking hypertension with the increased risk of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. 2022;17(11):2342–2346. DOI: 10.4103/1673-5374.336869
26. Sumners C, Alleyne A, Rodríguez V, et al. Brain angiotensin type-1 and type-2 receptors: cellular locations under normal and hypertensive conditions. *Hypertens Res*. 2020;43(4):281–295. DOI: 10.1038/S41440-019-0374-8
27. Mowry FE, Biancardi VC. Neuroinflammation in hypertension: the renin-angiotensin system versus pro-resolution pathways. *Pharmacol Res*. 2019;144:279–291. DOI: 10.1016/J.PHRS.2019.04.029
28. Liao W, Wu J. The ACE2/Ang (1–7)/MasR axis as an emerging target for antihypertensive peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2021;61(15):2572–2586. DOI: 10.1080/10408398.2020.1781049
29. Collombet JM, Masqueliez C, Four E, et al. Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus. *Neurosci Lett*. 2006;398(3):337–342. DOI: 10.1016/J.NEULET.2006.01.029
30. Ogino Y, Bernas T, Greer JE, Povlishock JT. Axonal injury following mild traumatic brain injury is exacerbated by repetitive insult and is linked to the delayed attenuation of NeuN expression without concomitant neuronal death in the mouse. *Brain Pathol*. 2022;32(2):e13034. DOI: 10.1111/BPA.13034
31. Tagami M, Nara Y, Kubota A, et al. Ultrastructural changes in cerebral pericytes and astrocytes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 1990;21(7):1064–1071. DOI: 10.1161/01.STR.21.7.1064
32. Ajdarova VS, Naumova OV, Kudokoceva OV, et al. Brain structure of SHR rats with genetically determined arterial hypertension. *World of medicine and biology*. 2018;14(2):115–119. (In Russ.) DOI: 10.26724/2079-8334-2018-2-64-115-119

Информация об авторе / Information about the author

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Валерия Алексеевна Разенкова — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии.
Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3997-2232>;
Scopus Author ID: 57219609984;
ResearcherID: AAH-1333-2021;
eLibrary SPIN: 8877-8902; e-mail: valeriya.raz@yandex.ru

Valeria A. Razenkova — PhD student, Junior Research Associate, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology.
Address: 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3997-2232>;
Scopus Author ID: 57219609984;
ResearcherID: AAH-1333-2021;
eLibrary SPIN: 8877-8902; e-mail: valeriya.raz@yandex.ru