

ВЛИЯНИЕ ТИПА АНЕСТЕЗИИ И УСЛОВИЙ ПРОКРАШИВАНИЯ ТКАНЕЙ МОЗГА КРАСИТЕЛЕМ 2,3,5-ТРИФЕНИЛТЕТРАЗОЛИЕМ ХЛОРИСТЫМ (ТТХ) НА ОЦЕНКУ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЗГА КРЫС НА РАННИХ СТАДИЯХ ПАТОГЕНЕЗА

Д. С. Билан^{1,2}, И. В. Кельмансон¹, В. В. Белоусов^{1,2} ✉

¹ Лаборатория молекулярных технологий, Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

² Отдел нейро-компьютерных интерфейсов, НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Изучение ишемического повреждения головного мозга является важным направлением современных медико-биологических исследований. К настоящему моменту разработано множество моделей ишемического инсульта, а также предложены различные способы визуализации поврежденных тканей мозга. В данной работе мы исследовали, как различные условия проведения эксперимента, моделирующего ишемический инсульт у крыс, влияют на интерпретацию результатов в острой фазе заболевания (5 ч с момента окклюзии средней мозговой артерии крысы). Мы показали, что на ранней стадии развития патологии существенное влияние оказывает выбор используемой анестезии животных. В наибольшей степени повреждение мозга было выражено при использовании для анестезии смеси хлоралгидрат/Рометар, в наименьшей — при использовании изофлурана. Для визуализации повреждения мозга животных мы использовали наиболее популярный краситель 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый (ТТХ). Мы установили, что температура и время инкубации срезов мозга в растворе ТТХ также значительно влияют на интерпретацию результатов при оценке ишемического повреждения в острой фазе патологии. Оптимальными условиями окрашивания срезов мозга в растворе ТТХ являются 30-минутная инкубация срезов при 37 °С.

Ключевые слова: инсульт, ишемическое повреждение, срезы мозга, 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый, окрашивание, анестезия, крысы

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 17-15-01175

✉ **Для корреспонденции:** Белоусов Всеволод Вадимович
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; belousov@ibch.ru

Статья получена: 29.11.2017 **Статья принята к печати:** 10.12.2017

THE CHOICE OF ANESTHETIC TYPE AND CONDITIONS FOR 2,3,5-TRIPHENYLTETRAZOLIUM CHLORIDE STAINING OF BRAIN SLICES IS IMPORTANT IN THE ASSESSMENT OF ISCHEMIC INJURY IN RATS IN THE EARLY STAGES OF PATHOLOGY

Bilan DS^{1,2}, Kelmanson IV¹, Belousov VV^{1,2} ✉

¹ Laboratory for Molecular Technologies, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Department of Brain-Computer Interfaces, Research Institute for Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Studies of ischemic brain injury are an important area of modern biomedical research. So far, a lot of ischemic stroke models have been proposed, along with different imaging and staining modalities aimed to visualize the damaged tissue. In this work we use a rat model to investigate how the experimental setup affects the interpretation of experimental data obtained in the acute phase of ischemic stroke (5 hours after the occlusion of the middle cerebral artery). We show the association between the choice of the type of anesthesia and the severity of ischemic injury: in our experiments brain damage was the most pronounced in the animals anesthetized with a combination of chloral hydrate and Rometar; the least damage was observed for isoflurane. Staining was performed using the popular dye 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). We demonstrate that parameters of brain slices incubation in TTC also need to be accounted for when interpreting the results obtained during the acute phase of stroke, the optimum incubation time being 30 min and temperature 37 °C.

Keywords: stroke, ischemic injury, brain slices, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, staining, anesthesia, rats

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant 17-15-01175)

✉ **Correspondence should be addressed:** Vsevolod Belousov
ul. Miklukho-Maklaya, d. 16/10, Moscow, Russia, 117997; belousov@ibch.ru

Received: 29.11.2017 **Accepted:** 10.12.2017

Ишемический инсульт головного мозга является одним из наиболее серьезных неврологических нарушений, занимающим второе место после сердечно-сосудистых заболеваний в структуре причин смертности и инвалидизации населения по всему миру [1–4]. На сегодняшний день не существует эффективной стратегии лечения этого заболевания, малоизученным остается и его патогенез.

К настоящему времени разработано несколько разных моделей ишемического инсульта [5–12], однако окклюзия средней мозговой артерии с помощью введения внутрь сосуда окклюдера (монофиламента) является наиболее популярной. Впервые эту модель описали Koizumi и соавт. [13], но с тех пор она была усовершенствована и сейчас адаптирована для различных лабораторных животных, например, для крыс [14] и мышей [15].

Помимо разных животных и разных моделей ишемического инсульта используют также разные способы визуализации поврежденной области мозга. Инфаркт можно выявить на срезах мозга, используя гистологические красители: самым распространенным подходом является окраска гематоксилин-эозином [16, 17], применяют и различные модификации окраски по методу Ниссля [18, 19]. Также существует способ импрегнации нервных тканей серебром. В некоторых работах отмечено, что такой подход позволяет зафиксировать дегенеративные процессы на более ранних стадиях патогенеза [20, 21]. Альтернативным подходом может быть использование флуоресцентных красок Fluoro-Jade [22–24], однако точный механизм действия этих красок пока неизвестен. Одним из самых простых способов визуализации поврежденной ткани на срезах мозга является ее окрашивание с помощью 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ) [25]. В живых клетках ферменты с дегидрогеназной активностью восстанавливают это соединение до производного формазана, который дает стабильное красное окрашивание здоровой ткани. В поврежденных областях, в которых нет функциональной активности митохондрий, окрашивания не происходит. Еще один подход основан на применении методов иммуногистохимии, которые позволяют визуализировать, например, апоптотические клетки в зоне поражения [26, 27]. К неинвазивным методам регистрации инсульта относятся магнитно-резонансная томография [28], позитронно-эмиссионная томография [29] и однофотонная эмиссионная компьютерная томография [30]. Это далеко не весь перечень подходов, с помощью которых можно визуализировать ишемический очаг повреждения, более подробная информация представлена в тематических обзорах [31].

Из-за разнообразия подходов к исследованию патогенеза инсульта и разработки методов его терапии в рамках регулярных конференций «Практические и фундаментальные проблемы терапии инсульта» (The Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, STAIR) было выпущено множество рекомендаций, касающихся важных аспектов экспериментального моделирования ишемического инсульта [32–35]. Согласно им результат исследования во многом зависит от выбора экспериментальной модели, линии животного, типа анестезии, способа визуализации повреждения мозга и других параметров.

При этом во многих исследованиях даже протоколы стандартных процедур могут существенно различаться. Например, способ визуализации поврежденной ткани на срезах мозга с помощью ТТХ используется в большинстве современных исследований. В оригинальной статье срезы мозга крысы спустя 24 ч с момента начала окклюзии про-

крашивали в растворе ТТХ в течение 30 мин при 37 °С [25]. Однако в ряде работ зафиксировать повреждение мозга с помощью этого подхода удалось уже через несколько часов с момента окклюзии [21, 36–43]. Кроме того, в разных работах варьируют длительность инкубации срезов мозга в растворе ТТХ от 5 мин [44] до общепринятых 30 мин [25]. В некоторых протоколах утверждается, что ТТХ нестабилен при нагревании, поэтому окрашивание ткани рекомендуют проводить при комнатной температуре [45]. В большинстве работ окрашивают срезы мозга, но в некоторых случаях животным проводят транскардиальную перфузию раствором ТТХ [38, 46].

В настоящей работе мы показали, что температура и время инкубации срезов мозга в растворе ТТХ значительно влияют на визуализацию поврежденной ткани мозга крыс в острой фазе перманентной ишемии, что может приводить к неверной интерпретации результатов экспериментов. Мы также продемонстрировали, что выбор используемой анестезии животного существенно влияет на степень ишемического повреждения на ранней стадии развития патологии (5 ч после окклюзии), в то время как на более поздних этапах (24 ч после окклюзии) это влияние нивелируется.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты с животными выполняли в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010. Протокол исследования был утвержден комиссией ИБХ РАН по контролю за содержанием и использованием животных.

Работу проводили на самцах крыс линии Wistar из питомника лабораторных животных «Пушино» весом от 280 до 330 г. Крыс содержали в виварии ИБХ РАН по 3 особи в пластмассовых клетках со свободным доступом к воде и пище.

Окклюзию средней мозговой артерии проводили по протоколу [14]. В работе использовали три вида анестезии:

1. изофлуран (Аерран, Baxter, США): введение в наркоз — 5 %, поддержание наркоза — 1,5 %;
2. тилетамин гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Золетил, Virbac Sante Animale, Франция; 40 мг/кг) + ксилазина гидрохлорид (Пометар, Bioveta, Чехия; 10 мг/кг) — внутривенная инъекция;
3. хлоралгидрат («Диаэм», Россия; 400 мг/кг).

Для обезболивания использовали кетопрофен (Ketonal, Sandoz, Швейцария; 5 мг/кг подкожно), местное обезболивание проводили с помощью 2 % новокаина.

В работе использовали готовые окклюдеры фирмы Docol (США) диаметром 0,185 мм, кат. No 403756PK10Re.

Через заданные промежутки времени крыс декапитировали, мозг вынимали и резали на фронтальные срезы толщиной 2 мм. Срезы помещали в 1 % раствор ТТХ (Sigma-Aldrich, США). Окраску проводили при комнатной температуре (20 °С) и при 37 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для того чтобы оценить, как разные условия прокраски тканей мозга с помощью красителя ТТХ влияют на визуализацию ишемического повреждения, мы использовали модель окклюзии средней мозговой артерии крыс [14]. В работе использовали перманентную окклюзию, т. е. сосуд

перекрывался окклюдером на все время эксперимента. Животных вводили в наркоз внутривенной инъекцией смеси препаратов Золетил и Рометар. Через 5 ч с момента окклюзии мозг каждого животного извлекали и получали фронтальные срезы толщиной 2 мм. Далее часть срезов помещали в 1 % раствор ТТХ при комнатной температуре, а часть — в заранее подогретый до 37 °С в инкубаторе раствор. Через равные временные промежутки мы фотографировали срезы мозга и оценивали, как температура и длительность инкубации срезов в растворе красителя влияет на визуализацию поврежденной ткани. Через 10 мин при обеих температурах, при которых проводилось окрашивание, можно было визуализировать область повреждения: она отличалась более слабым прокрашиванием по сравнению со здоровыми тканями среза (рис. 1). При дальнейшей инкубации срезов в растворе красителя более интенсивно окраска развивалась при 37 °С, при этом уже через 20 мин инкубации контраст между здоровой и поврежденной тканью существенно снизился, поскольку поврежденная область также прокрашивалась в промежуточный розовый цвет. При комнатной температуре контраст между поврежденной и неповрежденными областями, наоборот, усилился. При более длительной инкубации всех срезов при температуре 37 °С поврежденная область практически полностью прокрасилась (рис. 1). Следует подчеркнуть, что условия прокрашивания срезов мозга с помощью ТТХ наиболее важно контролировать именно при небольших интервалах времени с момента окклюзии сосуда, поскольку в поврежденной ткани еще могут присутствовать живые клетки, влияющие на развитие окрашивания. Через 24 ч после окклюзии область повреждения отчетливо визуализировалась с помощью ТТХ, при этом контраст с окрашенной здоровой тканью в дальнейшем не изменялся даже после двухчасовой инкубации при 37 °С.

Далее мы проверили, как выбор типа анестезии влияет на развитие ишемического повреждения мозга. Пов-

реждение ткани визуализировали с помощью прокрашивания в растворе ТТХ. В этой серии экспериментов также использовали модель перманентной окклюзии средней мозговой артерии у крыс линии Wistar. Животных вводили в наркоз тремя способами: изофлураном (Аерран), внутривенной инъекцией смеси препаратов Золетил и Рометар и внутривенной инъекцией смеси хлоралгидрата и Рометар. Через 5 ч после окклюзии мозг каждого животного извлекали и нарезали, срезы красили в 1 % растворе ТТХ при 37 °С в течение 30 мин. При использовании изофлурана область повреждения на срезе мозга была наименьшей, что было подтверждено на 6 животных. Кроме того, на этих срезах был минимально выражен контраст прокраски между поврежденными и здоровыми тканями. Наиболее выраженное повреждение наблюдалось при использовании смеси хлоралгидрат/Рометар, эффект стабильно подтвердился на 5 животных. Промежуточный результат наблюдался при использовании смеси Золетил/Рометар. Из 7 животных лишь у 2 развился выраженный обширный инсульт, в остальных 5 случаях зона повреждения при прокрашивании ТТХ была неконтрастной (рис. 2). Выбор типа анестезии, таким образом, также необходимо учитывать при исследовании острой фазы ишемии. В настоящий момент неясно, чем обусловлен наблюдаемый эффект. Нейропротективный эффект изофлурана уже отмечался в целом ряде работ [47–49], однако механизм его действия до сих пор не известен. Примечательно, что через 24 ч с момента окклюзии средней мозговой артерии крыс в нашем исследовании мы не выявили эффекта влияния типа анестезии на конечный объем повреждения мозга (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы анализировали влияние различных факторов на окраску срезов мозга крыс, подвергнутых перманентной ишемии, популярным красителем

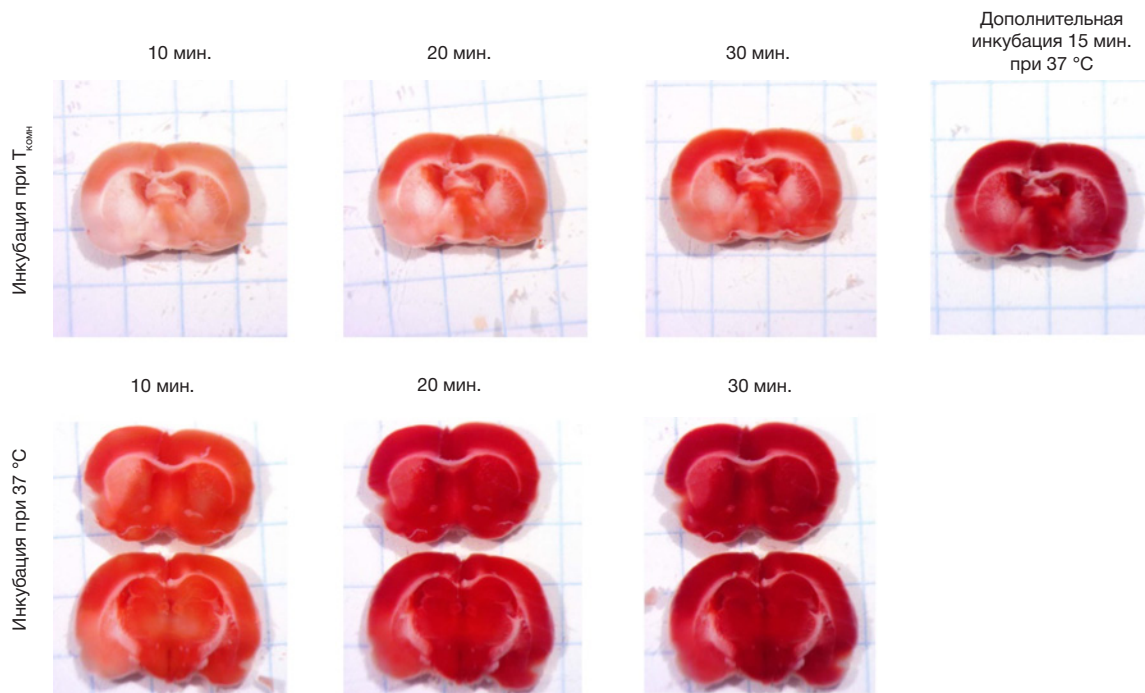


Рис. 1. Влияние температуры и длительности инкубации срезов мозга крысы в 1 % растворе ТТХ на визуализацию ишемического повреждения (5 ч с момента окклюзии). На рисунке представлены срезы мозга одной и той же крысы линии Wistar, подвергнутой окклюзии средней мозговой артерии. Один из срезов прокрашивали при комнатной температуре, два других — при 37 °С. Через указанные промежутки времени срезы фотографировали. Тип анестезии: Золетил/Рометар

ТТХ. Наши исследования показали, что данный метод визуализации поврежденной ткани на ранних стадиях развития патологии (5 ч с момента окклюзии сосуда) существенно зависит от типа используемой анестезии, а также от условий окрашивания ткани (температура, время). Таким образом, окрашивание ТТХ в качестве подхода для оценки объема повреждения мозга не следует проводить на ранних этапах развития ишемического инсульта, несмотря на ряд работ, утверждающих о такой возможности.

Кроме того, окрашивание ткани с помощью ТТХ не позволяет однозначно судить о жизнеспособности клеток в зоне повреждения в острой фазе развития инсульта. Данный краситель является индикатором дегидрогеназной активности митохондрий. Различные исследования подтверждают, что нарушение работы митохондрий действительно является одним из главных клеточных событий при повреждении тканей мозга вследствие ишемии [50, 51]. Однако возникает вопрос об интерпретации результатов в случае промежуточного окрашивания тканей мозга. В норме в живой ткани краситель ферментативным путем восстанавливается с образованием формазана, который окрашивает ткань в красный цвет. В мертвой ткани реакции не происходит, и ткань остается белой. Однако в наших экспериментах в зоне поражения наблюдалось

промежуточное розовое окрашивание, при этом интенсивность усиливалась с увеличением длительности инкубации срезов мозга в растворе красителя и при повышении температуры среды. В одной из работ была посчитана доля неповрежденных митохондрий в прокрашиваемых и не прокрашиваемых с помощью ТТХ тканях мозга. Показано, что в не прокрашиваемой зоне неповрежденными остаются около 5 % митохондрий [52]. Окрашивание ткани в промежуточный розовый цвет означает, что в этой области доля активных митохондрий значительно выше.

Известно, что при перманентной окклюзии митохондрии могут оставаться неповрежденными довольно долгое время (несколько часов или даже дней), при этом другие органы, например ядро, могут быть уже разрушены [52]. При этом визуализация с помощью ТТХ в этом случае не фиксирует повреждения ткани, что не отражает реальную картину развития патологии. При ишемии-реперфузии, которую принято считать более травматичной, повреждение митохондрий происходит быстрее. Это также необходимо учитывать при работе с определенными моделями инсульта. Кроме того, использовать ТТХ для визуализации инсульта не рекомендуется после 24 ч с момента окклюзии, поскольку в областях повреждения могут накапливаться клетки воспаления с неповрежденными митохондриями [52].



Рис. 2. Влияние типа анестезии на ишемическое повреждение мозга крыс, подвергнутых перманентной окклюзии средней мозговой артерии (5 ч с момента окклюзии). Срезы мозга окрашивали при одинаковых условиях в 1 % растворе ТТХ в течение 30 мин при 37 °С

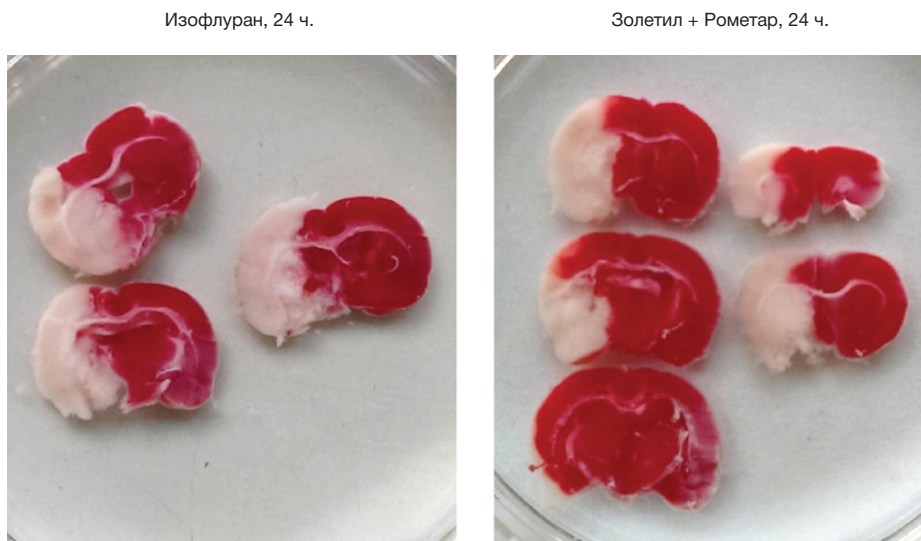


Рис. 3. Срезы мозга крыс после 24 ч перманентной окклюзии средней мозговой артерии с использованием разных типов анестезии во время операции. Срезы мозга окрашивали при одинаковых условиях в 1 % растворе ТТХ в течение 30 мин при 37 °С

ВЫВОДЫ

В настоящей работе мы показали, что различные факторы, такие как тип анестезии и условия окраски ткани с помощью красителя ТТХ, существенно влияют на оценку ишемического повреждения мозга на ранних этапах развития патологии у крыс, подвергнутых перманентной окклюзии средней мозговой артерии. Наименьшее повреждение мозга через 5 ч ишемии зафиксировано при использовании изофлурана, наибольшее — при использовании смеси хлоралгидрат/Рометар. Оптимальными условиями окрасивания срезов мозга в растворе ТТХ являются 30-ми-

нутная инкубация срезов при 37 °С. Использование встречающихся во многих публикациях протоколов, в которых используются более короткое время и более низкая температура инкубации, может приводить к некорректным результатам при исследовании ранних стадий развития ишемии. Однако уже через 24 ч с момента окклюзии развивается очаг повреждения, визуализация которого с помощью ТТХ не зависит от перечисленных факторов. Таким образом, данный временной интервал является оптимальным для качественного и количественного анализа ишемического повреждения мозга с помощью красителя ТТХ.

Литература

1. who.int [Internet]. World Health Organisation WHO. The top 10 causes of death; c2016 [cited Jan 2012]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
2. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K et al. Heart disease and stroke statistics—2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2009; 119 (3): e21–181. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191261.
3. Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, Mensah GA, Connor M, Bennett DA et al. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob Health*. 2013 Nov; 1 (5): e259–81. DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70089-5.
4. Стаховская Л. В., Ключихина О. А., Богатырева М. Д., Коваленко В. В. Эпидемиология инсульта в России по результатам территориально-популяционного регистра (2009–2010). *Журнал невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2013; 113 (5): 4–10.
5. Papadopoulos SM, Chandler WF, Salamat MS, Topol EJ, Sackellares JC. Recombinant human tissue-type plasminogen activator therapy in acute thromboembolic stroke. *J Neurosurg*. 1987 Sep; 67 (3): 394–8. DOI: 10.3171/jns.1987.67.3.0394.
6. Busch E, Kruger K, Hossmann KA. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res*. 1997 Dec 5; 778 (1): 16–24.
7. Roos MW, Ericsson A, Berg M, Sperber GO, Sjoquist M, Meyerson BJ. Functional evaluation of cerebral microembolization in the rat. *Brain Res*. 2003 Jan 24; 961 (1): 15–21.
8. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 1985 May; 17 (5): 497–504. DOI: 10.1002/ana.410170513.
9. Sharkey J, Ritchie IM, Kelly PA. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993 Sep; 13 (5): 865–71. DOI: 10.1038/jcbfm.1993.108.
10. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981; 1 (1): 53–60. DOI: 10.1038/jcbfm.1981.6.
11. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 May; 87 (1): 179–97. DOI: 10.1016/j.pbb.2007.04.015.
12. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Jul 2; 9: 3445–54. DOI: 10.2147/DDDT.S56071.
13. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn Stroke J*. 1986; 8: 1–8.
14. Uluc K, Miranpuri A, Kujoth GC, Akture E, Baskaya MK. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Vis Exp*. 2011 Feb 5; (48). pii: 1978. DOI: 10.3791/1978.
15. Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp*. 2011 Jan 6; (47). pii: 2423. DOI: 10.3791/2423.
16. Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J et al. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol*. 1993 Feb; 142 (2): 623–35.
17. Zhang RL, Chopp M, Jiang N, Tang WX, Probstak J, Manning AM et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke*. 1995 Aug; 26 (8): 1438–42; discussion 1443.
18. Li H, Zhang N, Lin HY, Yu Y, Cai QY, Ma L et al. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice. *BMC Neurosci*. 2014 May 2; 15: 58. DOI: 10.1186/1471-2202-15-58.
19. Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *J Vis Exp*. 2012; (69). pii: 4038. DOI: 10.3791/4038.
20. de Olmos JS, Beltramo CA, de Olmos de Lorenzo S. Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia, and physical trauma. *Neurotoxicol Teratol*. 1994 Nov-Dec; 16 (6): 545–61.
21. Vogel J, Mobius C, Kuschinsky W. Early delineation of ischemic tissue in rat brain cryosections by high-contrast staining. *Stroke*. 1999 May; 30 (5): 1134–41.
22. Schmued LC, Albertson C, Slikker W Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res*. 1997 Mar 14; 751 (1): 37–46.
23. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*. 2000 Aug 25; 874 (2): 123–30.
24. Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res*. 2005 Feb 21; 1035 (1): 24–31. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.11.054.
25. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke*. 1986 Nov-Dec; 17 (6): 1304–8.
26. Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR et al. Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995; 32 (1): 116–24. DOI: 10.1016/0169-328X(95)00069-5.
27. Xu XH, Zhang SM, Yan WM, Li XR, Zhang HY, Zheng XX. Development of cerebral infarction, apoptotic cell death and expression of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein

- following focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci.* 2006 Jan 11; 78 (7): 704–12. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.05.080.
28. Doyle FH, Pennock JM, Orr JS, Gore JC, Bydder GM, Steiner RE, et al. Imaging of the brain by nuclear magnetic resonance. *Lancet.* 1981; 2 (8237): 53–7.
 29. Kuhl DE, Phelps ME, Kowell AP, Metter EJ, Selin C, Winter J. Effects of stroke on local cerebral metabolism and perfusion: mapping by emission computed tomography of 18FDG and 13NH3. *Ann Neurol.* 1980; 8 (1): 47–60.
 30. Lassen NA, Henriksen L, Paulson O. Regional cerebral blood flow in stroke by 133Xenon inhalation and emission tomography. *Stroke.* 1981; 12 (3): 284–8.
 31. Zille M, Farr TD, Przesdzing I, Muller J, Sommer C, Dirnagl U et al. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Feb; 32 (2): 213–31. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.150.
 32. Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR. Rodent Stroke Model Guidelines for Preclinical Stroke Trials (1st Edition). *J Exp Stroke Transl Med.* 2009 Jan 1; 2 (2): 2–27.
 33. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable II (STAIR-II). Recommendations for clinical trial evaluation of acute stroke therapies. *Stroke.* 2001 Jul; 32 (7): 1598–606.
 34. Fisher M, Albers GW, Donnan GA, Furlan AJ, Grotta JC, Kidwell CS et al. Enhancing the development and approval of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry roundtable. *Stroke.* 2005; 36 (8): 1808–13.
 35. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* 2009 Jun; 40 (6): 2244–50. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.541128.
 36. Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One.* 2009; 4 (3): e4764. DOI: 10.1371/journal.pone.0004764.
 37. Liu F, Schafer DP, McCullough LD. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods.* 2009 Apr 30; 179 (1): 1–8. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.12.028.
 38. Benedek A, Moricz K, Juranyi Z, Gigger G, Levay G, Harsing LG et al. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2006 Oct 20; 1116 (1): 159–65. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.07.123.
 39. Jiang LJ, Zhang SM, Li CW, Tang JY, Che FY, Lu YC. Roles of the Nrf2/HO-1 pathway in the anti-oxidative stress response to ischemia-reperfusion brain injury in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Apr; 21 (7): 1532–40.
 40. Si J, Chen L, Xia Z. Effects of cervical-lymphatic blockade on brain edema and infarction volume in cerebral ischemic rats. *Chin J Physiol.* 2006 Oct 31; 49 (5): 258–65.
 41. Deng YH, He HY, Yang LQ, Zhang PY. Dynamic changes in neuronal autophagy and apoptosis in the ischemic penumbra following permanent ischemic stroke. *Neural Regen Res.* 2016 Jul; 11 (7): 1108–14. DOI: 10.4103/1673-5374.
 42. Morris GP, Wright AL, Tan RP, Gladbach A, Ittner LM, Vissel B. A Comparative study of variables influencing ischemic injury in the longa and Koizumi methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in mice. *PLoS One.* 2016 Feb 12; 11 (2): e0148503. DOI: 10.1371/journal.pone.0148503.
 43. Park HS, Han KH, Shin JA, Park JH, Song KY, Kim DH. The neuroprotective effects of carnosine in early stage of focal ischemia rodent model. *J Korean Neurosurg Soc.* 2014 Mar; 55 (3): 125–30. DOI: 10.3340/jkns.2014.55.3.125.
 44. Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol (Oxf).* 2011 Feb; 201 (2): 275–87. DOI: 10.1111/j.1748-1708.2010.02174.x.
 45. Chiang T, Messing RO, Chou WH. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *J Vis Exp.* 2011 Feb 13; (48). pii: 2761. DOI: 10.3791/2761.
 46. Dettmers C, Hartmann A, Rommel T, Kramer S, Pappata S, Young A, et al. Immersion and perfusion staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) compared to mitochondrial enzymes 6 hours after MCA-occlusion in primates. *Neurol Res.* 1994; 16 (3): 205–8.
 47. Zheng S, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol.* 2004 May; 65 (5): 1172–80. DOI: 10.1124/mo.65.5.1172.
 48. Chen F, Long Z, Yin J, Zuo Z, Li H. Isoflurane post-treatment improves outcome after an embolic stroke in rabbits. *PLoS One.* 2015; 10 (12): e0143931. DOI: 10.1371/journal.pone.0143931.
 49. Sun M, Deng B, Zhao X, Gao C, Yang L, Zhao H et al. Isoflurane preconditioning provides neuroprotection against stroke by regulating the expression of the TLR4 signalling pathway to alleviate microglial activation. *Sci Rep.* 2015 Jun 18; 5: 11445. DOI: 10.1038/srep11445.
 50. Christophe M, Nicolas S. Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des.* 2006; 12 (6): 739–57.
 51. Solenski NJ, diPierro CG, Trimmer PA, Kwan AL, Helm GA. Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke.* 2002 Mar; 33 (3): 816–24.
 52. Liszczak TM, Hedley-Whyte ET, Adams JF, Han DH, Kolluri VS, Vacanti FX, et al. Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. *Acta Neuropathol.* 1984; 65 (2): 150–7.

References

1. who.int [Internet]. World Health Organisation WHO. The top 10 causes of death; c2016 [cited Jan 2012]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
2. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K et al. Heart disease and stroke statistics—2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 2009; 119 (3): e21–181. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191261.
3. Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, Mensah GA, Connor M, Bennett DA et al. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob Health.* 2013 Nov; 1 (5): e259–81. DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70089-5.
4. Stakhovskaia LV, Klochikhina OA, Bogatyreva MD, Kovalenko VV. [Epidemiology of stroke in the Russian Federation: results of territory's population registry]. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii Im. S. S. Korsakova.* 2013; 113 (5): 4–10. Russian.
5. Papadopoulos SM, Chandler WF, Salamat MS, Topol EJ, Sackellares JC. Recombinant human tissue-type plasminogen activator therapy in acute thromboembolic stroke. *J Neurosurg.* 1987 Sep; 67 (3): 394–8. DOI: 10.3171/jns.1987.67.3.0394.
6. Busch E, Kruger K, Hossmann KA. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res.* 1997 Dec 5; 778 (1): 16–24.
7. Roos MW, Ericsson A, Berg M, Sperber GO, Sjoquist M, Meyerson BJ. Functional evaluation of cerebral microembolization in the rat. *Brain Res.* 2003 Jan 24; 961 (1): 15–21.
8. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol.* 1985 May; 17 (5): 497–504. DOI: 10.1002/ana.410170513.
9. Sharkey J, Ritchie IM, Kelly PA. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993 Sep; 13 (5): 865–71. DOI:

- 10.1038/jcbfm.1993.108.
10. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981; 1 (1): 53–60. DOI: 10.1038/jcbfm.1981.6.
 11. Durukan A, Tattisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 May; 87 (1): 179–97. DOI: 10.1016/j.pbb.2007.04.015.
 12. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther.* 2015 Jul 2; 9: 3445–54. DOI: 10.2147/DDDT.S56071.
 13. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn Stroke J.* 1986; 8: 1–8.
 14. Uluc K, Miranpuri A, Kujoth GC, Akture E, Baskaya MK. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Vis Exp.* 2011 Feb 5; (48). pii: 1978. DOI: 10.3791/1978.
 15. Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp.* 2011 Jan 6; (47). pii: 2423. DOI: 10.3791/2423.
 16. Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J et al. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol.* 1993 Feb; 142 (2): 623–35.
 17. Zhang RL, Chopp M, Jiang N, Tang WX, Probst J, Manning AM et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke.* 1995 Aug; 26 (8): 1438–42; discussion 1443.
 18. Li H, Zhang N, Lin HY, Yu Y, Cai QY, Ma L et al. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice. *BMC Neurosci.* 2014 May 2; 15: 58. DOI: 10.1186/1471-2202-15-58.
 19. Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *J Vis Exp.* 2012; (69). pii: 4038. DOI: 10.3791/4038.
 20. de Olmos JS, Beltramino CA, de Olmos de Lorenzo S. Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia, and physical trauma. *Neurotoxicol Teratol.* 1994 Nov-Dec; 16 (6): 545–61.
 21. Vogel J, Mobius C, Kuschinsky W. Early delineation of ischemic tissue in rat brain cryosections by high-contrast staining. *Stroke.* 1999 May; 30 (5): 1134–41.
 22. Schmued LC, Albertson C, Slikker W Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 1997 Mar 14; 751 (1): 37–46.
 23. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 2000 Aug 25; 874 (2): 123–30.
 24. Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 2005 Feb 21; 1035 (1): 24–31. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.11.054.
 25. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1986 Nov-Dec; 17 (6): 1304–8.
 26. Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR et al. Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995; 32 (1): 116–24. DOI: 10.1016/0169-328X(95)00069-5.
 27. Xu XH, Zhang SM, Yan WM, Li XR, Zhang HY, Zheng XX. Development of cerebral infarction, apoptotic cell death and expression of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein following focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci.* 2006 Jan 11; 78 (7): 704–12. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.05.080.
 28. Doyle FH, Pennock JM, Orr JS, Gore JC, Bydder GM, Steiner RE, et al. Imaging of the brain by nuclear magnetic resonance. *Lancet.* 1981; 2 (8237): 53–7.
 29. Kuhl DE, Phelps ME, Kowell AP, Metter EJ, Selin C, Winter J. Effects of stroke on local cerebral metabolism and perfusion: mapping by emission computed tomography of 18FDG and 13NH3. *Ann Neurol.* 1980; 8 (1): 47–60.
 30. Lassen NA, Henriksen L, Paulson O. Regional cerebral blood flow in stroke by 133Xenon inhalation and emission tomography. *Stroke.* 1981; 12 (3): 284–8.
 31. Zille M, Farr TD, Przesdzing I, Muller J, Sommer C, Dirnagl U et al. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Feb; 32 (2): 213–31. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.150.
 32. Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR. Rodent Stroke Model Guidelines for Preclinical Stroke Trials (1st Edition). *J Exp Stroke Transl Med.* 2009 Jan 1; 2 (2): 2–27.
 33. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable II (STAIR-II). Recommendations for clinical trial evaluation of acute stroke therapies. *Stroke.* 2001 Jul; 32 (7): 1598–606.
 34. Fisher M, Albers GW, Donnan GA, Furlan AJ, Grotta JC, Kidwell CS et al. Enhancing the development and approval of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry roundtable. *Stroke.* 2005; 36 (8): 1808–13.
 35. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* 2009 Jun; 40 (6): 2244–50. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.541128.
 36. Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One.* 2009; 4 (3): e4764. DOI: 10.1371/journal.pone.0004764.
 37. Liu F, Schafer DP, McCullough LD. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods.* 2009 Apr 30; 179 (1): 1–8. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.12.028.
 38. Benedek A, Moricz K, Juranyi Z, Gigler G, Levay G, Harsing LG et al. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2006 Oct 20; 1116 (1): 159–65. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.07.123.
 39. Jiang LJ, Zhang SM, Li CW, Tang JY, Che FY, Lu YC. Roles of the Nrf2/HO-1 pathway in the anti-oxidative stress response to ischemia-reperfusion brain injury in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Apr; 21 (7): 1532–40.
 40. Si J, Chen L, Xia Z. Effects of cervical-lymphatic blockade on brain edema and infarction volume in cerebral ischemic rats. *Chin J Physiol.* 2006 Oct 31; 49 (5): 258–65.
 41. Deng YH, He HY, Yang LQ, Zhang PY. Dynamic changes in neuronal autophagy and apoptosis in the ischemic penumbra following permanent ischemic stroke. *Neural Regen Res.* 2016 Jul; 11 (7): 1108–14. DOI: 10.4103/1673-5374.
 42. Morris GP, Wright AL, Tan RP, Gladbach A, Ittner LM, Vissel B. A Comparative study of variables influencing ischemic injury in the longa and Koizumi methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in mice. *PLoS One.* 2016 Feb 12; 11 (2): e0148503. DOI: 10.1371/journal.pone.0148503.
 43. Park HS, Han KH, Shin JA, Park JH, Song KY, Kim DH. The neuroprotective effects of carnosine in early stage of focal ischemia rodent model. *J Korean Neurosurg Soc.* 2014 Mar; 55 (3): 125–30. DOI: 10.3340/jkns.2014.55.3.125.
 44. Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol (Oxf).* 2011 Feb; 201 (2): 275–87. DOI: 10.1111/j.1748-1708.2010.02174.x.
 45. Chiang T, Messing RO, Chou WH. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *J Vis Exp.* 2011 Feb 13; (48). pii: 2761. DOI: 10.3791/2761.
 46. Dettmers C, Hartmann A, Rommel T, Kramer S, Pappata S, Young A, et al. Immersion and perfusion staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) compared to mitochondrial enzymes 6 hours after MCA-occlusion in primates. *Neurol Res.* 1994; 16 (3): 205–8.
 47. Zheng S, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces

- neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol*. 2004 May; 65 (5): 1172–80. DOI: 10.1124/mo.65.5.1172.
48. Chen F, Long Z, Yin J, Zuo Z, Li H. Isoflurane post-treatment improves outcome after an embolic stroke in rabbits. *PLoS One*. 2015; 10 (12): e0143931. DOI: 10.1371/journal.pone.0143931.
 49. Sun M, Deng B, Zhao X, Gao C, Yang L, Zhao H et al. Isoflurane preconditioning provides neuroprotection against stroke by regulating the expression of the TLR4 signalling pathway to alleviate microglial activation. *Sci Rep*. 2015 Jun 18; 5: 11445. DOI: 10.1038/srep11445.
 50. Christophe M, Nicolas S. Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des*. 2006; 12 (6): 739–57.
 51. Solenski NJ, diPierro CG, Trimmer PA, Kwan AL, Helm GA. Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke*. 2002 Mar; 33 (3): 816–24.
 52. Liszczak TM, Hedley-Whyte ET, Adams JF, Han DH, Kolluri VS, Vacanti FX, et al. Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. *Acta Neuropathol*. 1984; 65 (2): 150–7.