

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

EXPERIMENTAL RESEARCH

Патологическая физиология

Pathology

doi: 10.25005/2074-0581-2026-28-2-454-470

ДИНАМИКА НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИОННОЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТУЛИЕВОЙ ЛАЗЕРНОЙ СИСТЕМЫ НА ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

Р.А. СУФИАНОВ^{1,2,3}, С.С. ДЫДЫКИН⁴, М.Р. МАМАТХАНОВ⁵, Д.А. МУРЗАЕВА³, Н.А. ГАРИФУЛЛИНА^{3,6},
А.А. СУФИАНОВ^{1,3,7}

¹ Кафедра нейрохирургии, Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского, Москва, Российская Федерация

² Отделение нейроонкологии, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Российская Федерация

³ Федеральный центр нейрохирургии, Тюмень, Российская Федерация

⁴ Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация

⁵ Детская городская клиническая больница им. З.А. Башляевой Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Российская Федерация

⁶ Кафедра фармакологии, Тюменский государственный медицинский университет, Тюмень, Российская Федерация

⁷ Учебно-научный институт нейрохирургии, Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Российская Федерация

Цель исследования: изучить МР-визуализационные и морфологические изменения подкорковых тканей головного мозга крысы в различные сроки после воздействия 2010-нм тулиевого волоконного лазера в условиях эксперимента.

Материал и методы: исследование было проведено на 20 беспородных крысах массой 180-200 г. Животные разделены на 4 группы по 5 крыс. Стереотаксическая лазерная абляция мощностью 5 Вт и энергией 10 Дж выполнена в проекции правой теменной доли. Гистологическое исследование было осуществлено 4 группам на 1-е (сразу после абляции, I группа), 3-и (II группа), 7-е (III группа) и 30-е (IV группа) сутки. Дополнительно IV группе выполнена магнитно-резонансная томография (МРТ) в T2 PROPELLER режиме на 1-е (сразу после абляции), 3-и, 7-е, 30-е сутки после абляции.

Результаты: по данным МРТ сразу после абляции центральная зона поражения была практически изоинтенсивна контрлатеральному полушарию (КП) (КП принято за 1,0; относительная интенсивность (ОИ) – 1,01 [0,84; 1,06]), а периферическая зона характеризовалась сниженной ОИ сигнала – 0,79 [0,73; 0,95]. На 3-и, 7-е, 30-е сутки наблюдалось повышение ОИ зоны поражения в сравнении с 1-ми сутками после абляции – 1,88 [1,70; 1,94]; 1,92 [1,76; 1,98]; 2,82 [2,68; 2,86] соответственно ($p=0,001$) и колебания ОИ периферической зоны – 0,93 [0,86; 1,11]; 0,96 [0,89; 1,14]; 0,88 [0,80; 1,11] соответственно ($p>0,05$). Размер очага повреждения по данным МРТ на 3-и и 7-е сутки имел тенденцию к увеличению до 4,79 [3,46; 5,24] мм² и 4,63 [4,01; 4,83] мм² соответственно по сравнению с 1-ми сутками – 2,40 [1,45; 2,70] мм². К 30-м суткам произошло его уменьшение до 4,03 [2,72; 4,46] мм². Статистически значимых различий размеров очага между сроками наблюдения не выявлено ($p=0,035$). При морфологическом исследовании у крыс сразу после абляции в основном наблюдались признаки механического повреждения ткани головного мозга, а также умеренные ишемические изменения с формирующимися микронекрозами. На 3-и сутки доминировал резко выраженный отёк с крупными очагами некроза. На 7-е сутки в центре постлучевой зоны формировалась кистозная полость с умеренной макрофагальной инфильтрацией. На 30-е сутки формировалась неистинная киста, выявлялись признаки неопластического некроза и незначительно выраженной грануляционной ткани, что свидетельствовало о начале репаративных процессов ткани головного мозга.

Заключение: воздействие 2010-нм лазерного излучения на ткань головного мозга сопровождается последовательной сменой морфологических фаз от ишемически-некротического повреждения до формирования отграниченной неистинной кисты с признаками репарации. Локальная отграниченность зоны воздействия свидетельствует о контролируемом характере лазерной абляции.

Ключевые слова: тулиевый волоконный лазер, лазерная абляция головного мозга, гистологические методы, методы нейровизуализации.

Для цитирования: Суфианов РА, Дыдыкин СС, Маматханов МР, Мурзаева ДА, Гарифуллина НА, Суфианов АА. Динамика нейровизуализационной и морфологической картины при воздействии тулиевой лазерной системы на ткани головного мозга крысы. *Вестник Авиценны*. 2026;28(2):454-70. <https://doi.org/10.25005/2074-0581-2026-28-2-454-470>

DYNAMICS OF NEUROIMAGING AND MORPHOLOGICAL CHANGES FOLLOWING EXPOSURE OF RAT BRAIN TISSUE TO A THULIUM LASER SYSTEM

R.A. SUFIANOV^{1,2,3}, S.S. DYDYKIN⁴, M.R. MAMATKHANOV⁵, D.A. MURZAEVA³, N.A. GARIFULLINA^{3,6},
A.A. SUFIANOV^{1,3,7}

¹ Department of Neurosurgery, Russian Scientific Center of Surgery named after Academician B.V. Petrovsky, Moscow, Russian Federation

² Department of Neurooncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

³ Federal Center of Neurosurgery, Tyumen, Russian Federation

⁴ Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

⁵ Children's City Clinical Hospital named after Z.A. Bashlyeva, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

⁶ Department of Pharmacology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

⁷ Educational and Scientific Institute of Neurosurgery, Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russian Federation

Objective: To investigate MRI and morphological changes in the subcortical tissues of the rat brain at different time points after exposure to a 2010-nm thulium fiber laser under experimental conditions.

Methods: The study was conducted on 20 outbred rats weighing 180-200 g. The animals were divided into four groups of five rats each. Stereotactic laser ablation was performed in the projection of the right parietal lobe using a power output of 5 W and an energy setting of 10 J. Histological examination was carried out in groups 1-4 on day 1 (immediately after ablation, Group 1), day 3 (Group 2), day 7 (Group 3), and day 30 (Group 4) after the procedure. In addition, magnetic resonance imaging (MRI) in the T2 PROPELLER sequence was performed in Group 4 on day 1 (immediately after ablation), day 3, day 7, and day 30 following ablation.

Results: MRI demonstrated that immediately after ablation, the central lesion area was almost isointense to the contralateral hemisphere (CH, used as the reference value of 1.0); relative signal intensity (RSI) of the central lesion area was 1.01 [0.84-1.06], while the peripheral area exhibited reduced RSI – 0.79 [0.73-0.95]. On days 3, 7, and 30, an increase in RSI of the lesion area compared to the first day after ablation was observed: 1.88 [1.70; 1.94], 1.92 [1.76; 1.98], and 2.82 [2.68; 2.86], respectively ($p=0.001$), whereas RSI in the peripheral zone decreased: 0.93 [0.86; 1.11], 0.96 [0.89; 1.14], and 0.88 [0.80; 1.11], respectively ($p>0.05$). The lesion size, according to MRI, increased on days 3 and 7 to 4.79 [3.46; 5.24] mm² and 4.63 [4.01; 4.83] mm², respectively. By day 30, it decreased to 4.03 [2.72; 4.46] mm². No statistically significant differences in lesion size were found between the observation time points ($p=0.0351$). Morphological examination of rats immediately after ablation revealed primarily mechanical damage to brain tissue, along with moderate ischemic changes and developing micronecroses. On day 3, edema was pronounced, with large foci of necrosis predominated. On day 7, a cystic cavity with moderate macrophage infiltration formed in the center of the post-radiation zone. On day 30, a pseudocyst was formed; signs of neoangiogenesis and mildly expressed granulation tissue were detected, indicating the onset of reparative processes in brain tissue.

Conclusion: Exposure of brain tissue to 2010-nm laser irradiation results in a sequential progression of morphological phases, from ischemic-necrotic injury to the formation of a well-demarcated pseudocyst accompanied by reparative changes. The confined nature of the lesion suggests that laser ablation is a controlled and spatially precise procedure.

Keywords: Thulium-doped fiber laser, laser ablation of the brain, histological methods, neuroimaging methods.

For citation: Sufianov RA, Dydykin SS, Mamatkhanov MR, Murzaeva DA, Garifullina NA, Sufianov AA. Dinamika neyrovizualizatsionnoy i morfologicheskoy kartiny pri vozdeystvii tulievoy lazernoy sistemy na tkani golovnogogo mozga krysy [Dynamics of neuroimaging and morphological changes following exposure of rat brain tissue to a thulium laser system]. *Vestnik Avitsenny [Avicenna Bulletin]*. 2026;28(2):454-70. <https://doi.org/10.25005/2074-0581-2026-28-2-454-470>

ВВЕДЕНИЕ

С момента создания первых лазеров начались активные исследования лазерного воздействия на биологические ткани. Внедрение лазерных технологий в нейрохирургическую практику датируется 1965 годом, с тех пор прослеживается тенденция технического прогресса в области разработки волоконных лазерных технологий [1, 2].

При проведении нейрохирургических операций важным аспектом является эффективное коагуляционное свойство лазера [3]. Среди лазерных систем наиболее широко используются неодимовые и диодные. Хотя Nd:YAG-лазер демонстрирует высокую гемостатическую эффективность (1060-1340 нм), его глубокое проникновение в ткани может привести к повреждению критических мозговых структур, что ограничивает применение в нейрохирургических операциях [4].

На сегодняшний день перспективным направлением для изучения является применение тулиевого лазера в нейрохирургии. Непрерывноволновые тулиево-волоконные (Tm: fiber) лазеры обладают большим потенциалом, благодаря длине волны 2010 нм и её спектральной близости к пику водопоглощения [5]. В водной среде волокна из кремнезёма не могут передавать световую энергию более, чем на 2 мм от переднего края лазерного наконечника. Поэтому любая ткань, локализованная в более, чем 2 мм от наконечника, защищена водной средой [6].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить МР-визуализационные и морфологические изменения подкорковых тканей головного мозга крысы в различные сроки после воздействия 2010-нм тулиевого волоконного лазера в условиях эксперимента.

INTRODUCTION

Since the development of the first lasers, active research has examined the effects of laser radiation on biological tissues. The introduction of laser technologies into neurosurgical practice dates back to 1965; since then, steady technical progress has been observed in the development of fiber laser technologies [1, 2].

An important aspect of neurosurgical procedures is the laser's effective coagulation capability [3]. Among laser systems, neodymium and diode lasers are the most widely used. Although the Nd:YAG laser demonstrates high hemostatic efficacy at wavelengths of 1060-1340 nm, its deep tissue penetration may damage critical brain structures, thereby limiting its use in neurosurgical operations [4].

At present, the use of the thulium laser in neurosurgery is a promising field of investigation. Continuous-wave thulium-doped fiber lasers have considerable potential owing to their wavelength of 2010 nm and their spectral proximity to the water absorption peak [5]. In an aqueous medium, silica fibers cannot transmit light energy more than 2 mm from the front edge of the laser tip. Therefore, any tissue located more than 2 mm from the tip is protected by the aqueous medium [6].

PURPOSE OF THE STUDY

To investigate MRI and morphological changes in the subcortical tissues of the rat brain at different time points after exposure to a 2010-nm thulium fiber laser under experimental conditions.

METHODS

The study was conducted on 20 outbred rats weighing 180-200 g. The laboratory rats were housed under standard animal

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на 20 беспородных крысах массой 180-200 г. Лабораторные крысы содержались в стандартных условиях вивария с контролируемыми параметрами микроклимата: температура воздуха 22-28°C, световой режим 12:12 (12 часов световой режим, 12 часов ночной режим), свободный доступ к стандартному гранулированному корму и питьевой воде.

Все подопытные животные были случайным образом распределены на 4 группы по 5 крыс в каждой в соответствии с периодом их исключения из эксперимента. В I группу вошли крысы, исключённые сразу после стереотаксической лазерной абляции, а во II, III и IV группы – особи, выведенные из исследования через 3-и, 7-е, 30-е сутки.

Анестезия животных осуществлялась внутривенным введением комбинации тилетамин-золазепам (Zoletil® 100, Virbac, France) в дозе 7,5 мг/кг и ксилазина (Xyla®, Interchemie, the Netherlands) в дозе 10 мг/кг. Экспериментальные животные позиционировались в спроектированную и распечатанную на 3D-принтере стереотаксическую дугу для крыс. Конструкция обеспечивала надёжную фиксацию головы животного посредством билатеральных держателей в области наружных слуховых проходов и зубной планки для фиксации передних зубов (рис. 1).

Используемые для печати материалы были МР-негативные, что позволило проводить МРТ без сопутствующих артефактов. После подготовки операционного поля под микроскопом производился линейный разрез кожи и подлежащих тканей длиной 2

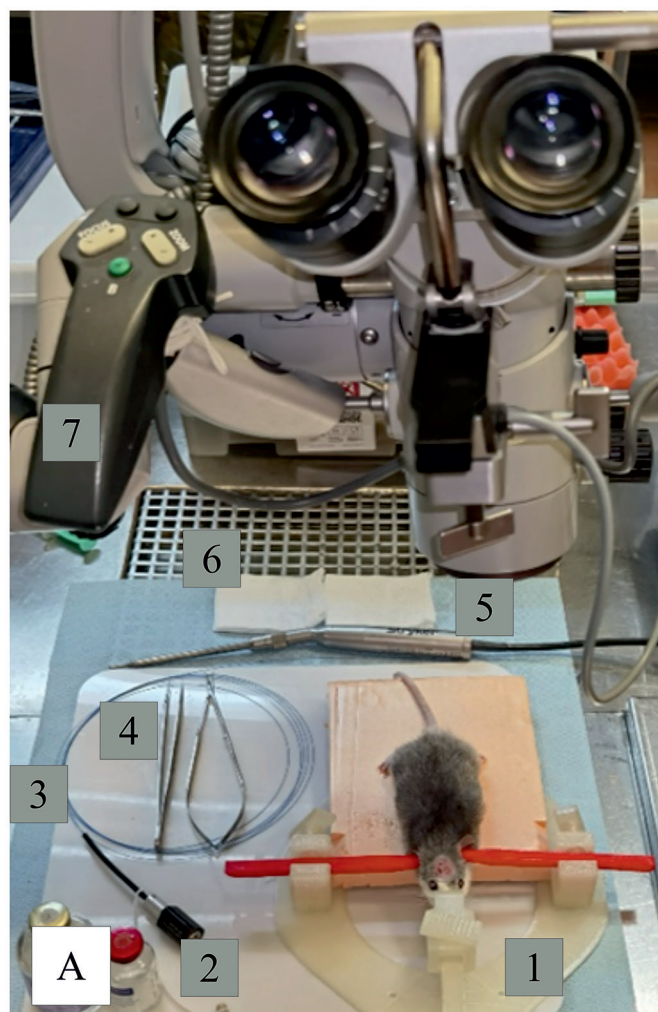
house conditions with controlled microclimate parameters: air temperature of 22-28°C, a 12:12 light-dark cycle, and free access to standard pelleted feed and drinking water.

All experimental animals were randomly divided into four groups of five rats each according to the time point at which they were withdrawn from the experiment. Group 1 included rats withdrawn immediately after stereotactic laser ablation, whereas groups 2, 3, and 4 included animals withdrawn from the study on days 3, 7, and 30, respectively.

Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of tiletamine-zolazepam (Zoletil® 100, Virbac, France; 7.5 mg/kg) and xylazine (Xyla®, Interchemie, the Netherlands; 10 mg/kg). The

Рис. 1 Общий вид рабочего места для проведения эксперимента (А) и фиксация крысы в стереотаксической раме (В): 1 – расположение крысы на экспериментальном столе, 2 – препараты для наркотизации лабораторных животных (Zoletil® 100, Xyla®), 3 – лазерный зонд Optical Fiber Single Use 272 µm, 4 – микроинструменты: микропинцет и микроножницы, 5 – высокоскоростной бор, 6 – марлевая салфетка, 7 – операционный микроскоп

Fig. 1 General view of the experimental workstation (A) and fixation of the rat in the stereotactic frame (B): 1 – positioning of the rat on the experimental table; 2 – drugs used for anesthesia of laboratory animals (Zoletil® 100, Xyla®); 3 – Optical Fiber Single Use 272 µm laser probe; 4 – microinstruments: microforceps and microscissors; 5 – high speed burr; 6 – gauze swab; 7 – operating microscope



см. Кожно-апоневротический лоскут подшивался колющей иглой 6,0 и отодвигался с целью визуализации операционного поля. Трефинационное отверстие выполнялось высокоскоростным бором на 2 мм латеральнее и на 4 мм дорсальнее брегмы в проекции теменной доли головного мозга.

Стереотаксическая лазерная абляция проводилась с помощью хирургической тулиевой лазерной системы CyberTM (Quanta System, Italy) мощностью до 200 Вт с использованием одноразового оптического волокна диаметром 272 мкм (Quanta System, Italy).

В ходе предварительного скринингового исследования были выявлены оптимальные параметры лазерного излучения, которые приводили к минимальной летальности лабораторных животных. Унилатеральное лазерное воздействие осуществлялось в правой половине полушария в проекции теменной доли головного мозга, мощностью 5 Вт, энергией 10 Дж. Лазерный зонд был проведён на глубину 3,0 мм от поверхности твёрдой мозговой оболочки. После воздействия лазера оптоволоконно выдерживалось в течение 3 минут в области поражения с целью охлаждения (рис. 2, рис. 3А).

Для оценки выраженности лазерного повреждения во всех экспериментальных группах проводилось гистологическое исследование. Дополнительно у крыс IV группы (выведенных из эксперимента на 30-е сутки) под вышеуказанной седацией выполнялся динамический нейровизуализационный мониторинг с помощью МРТ в T2 PROPELLER режиме в аксиальной проекции (Discovery MR750w 3.0 Тл) сразу после операции (1-е сутки), 3-и, 7-е и 30-е сутки с расположением среза на уровне кончика лазерного зонда (рис. 3В). Измерение интенсивности МР-сигнала и площади размера очага абляции проводилось с использованием стандартных измерительных инструментов (closed polygon) программы RadiAnt DICOM Viewer (ver. 2021.2) (Medixant, Poland)). Результаты измерения представлены в мм². Вычислялась относительная плотность МР-сигнала в сравнении с плотностью в контрлатеральном полушарии (КП). Результаты были представлены в относительных без-

experimental animals were positioned in a stereotactic frame designed for rats and produced using a 3D printer. The design provided reliable fixation of the animal's head by means of bilateral holders placed in the region of the external auditory meatus and a tooth bar for fixation of the incisors (Fig. 1).

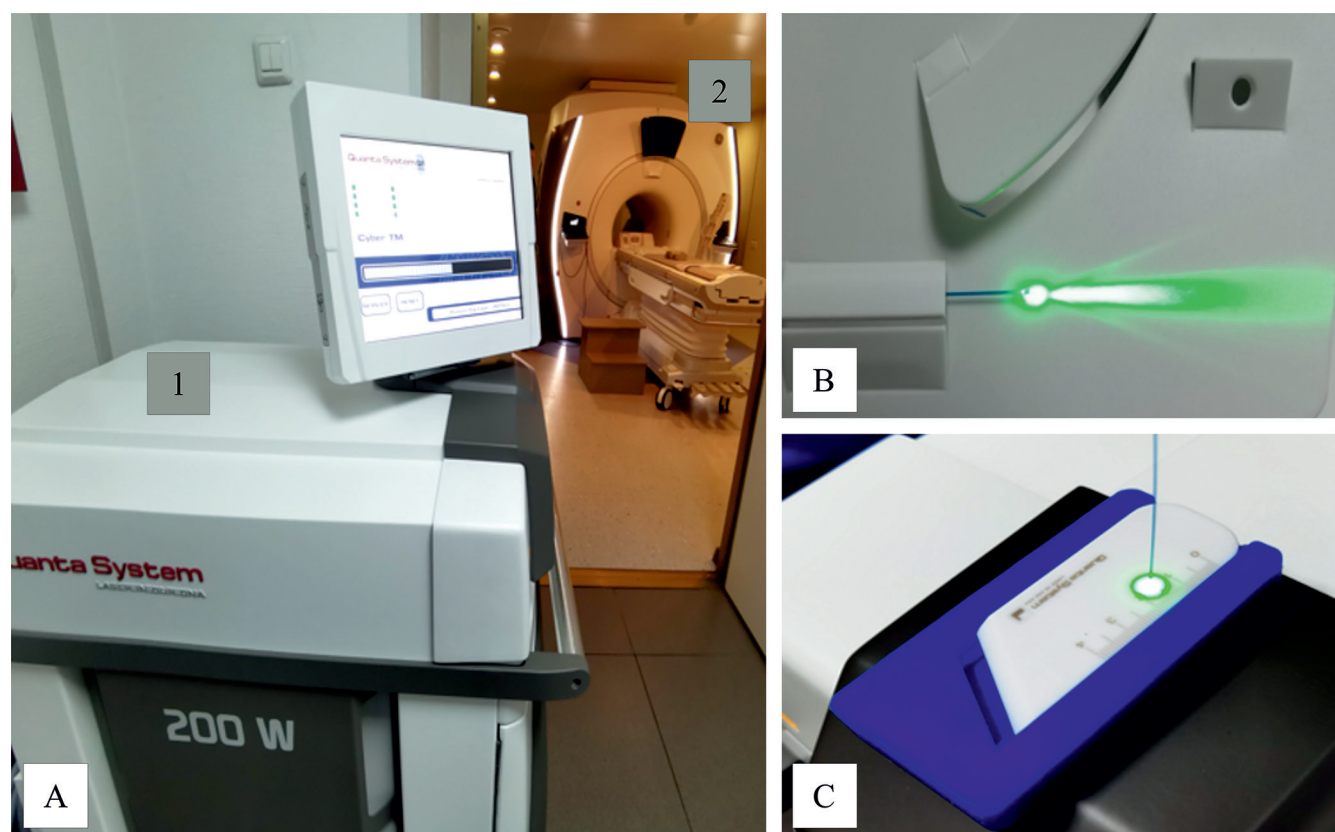
The materials used for 3D printing were MR-negative, enabling MRI without associated artifacts. After preparation of the surgical field, a 2-cm linear incision of the skin and underlying tissues was made under microscopic visualization. The cutaneous-aponeurotic flap was sutured with a 6-0 puncture needle and retracted in order to visualize the operative field. A burr hole was created using a high-speed burr 2 mm lateral and 4 mm dorsal to bregma, in the projection of the parietal lobe of the brain.

Stereotactic laser ablation was performed with a CyberTM surgical thulium-doped laser system (Quanta System, Italy) at up to 200 W, using a disposable optical fiber with a diameter of 272 μ m (Quanta System, Italy).

During the preliminary screening study, optimal laser irradiation parameters were identified, resulting in minimal mortality among the laboratory animals. Unilateral laser exposure was applied to the right cerebral hemisphere in the parietal lobe projection, at a power of 5 W and an energy of 10 J. The laser probe was advanced to a depth of 3.0 mm beneath the dura mater. After

Рис. 2 Общий вид МРТ кабинета и оборудования (А): 1 – тулиевый лазер системы Cyber TM мощностью 200 Вт (Quanta System, Italy); (В) – линейная длина светового пучка тулиевого лазера; (С) – радиальная длина светового пучка тулиевого лазера

Fig. 2 General view of the MRI room and equipment (A): 1 – CyberTM thulium laser system with a power of 200 W (Quanta System, Italy); (B) – linear length of the thulium laser beam; (C) – radial length of the thulium laser beam



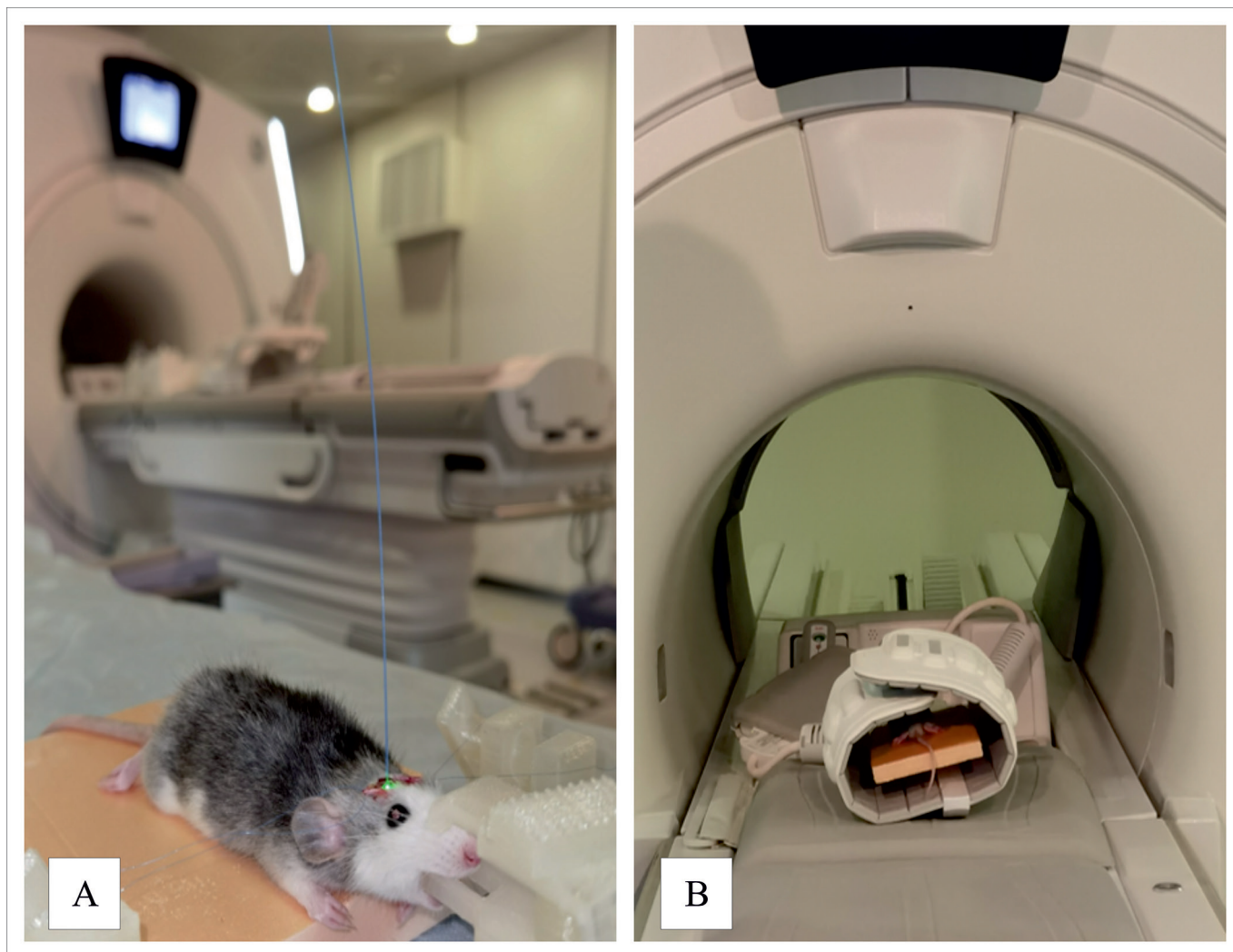


Рис. 3 Общий вид МРТ-операционной: (А) – выполнение стереотаксической лазерной абляции; (В) – проведение МРТ на аппарате Discovery MR750w 3.0 Тл (GE Healthcare, USA)

Fig. 3 General view of the MRI operating room: (A) stereotactic laser ablation procedure; (B) MRI performed using a Discovery MR750w 3.0T scanner (GE Healthcare, USA)

размерных единицах. Интенсивность КП принята за единицу; относительно неё рассчитывали относительную интенсивность (ОИ) сигнала в зонах поражения.

С целью проведения гистологического исследования животных подвергали выведению из эксперимента путём наркотизации экспериментальных животных (внутрибрюшинное введение комбинации тилетамина-золазепама (Zoletil® 100, Virbac, France) в дозе 7,5 мг/кг и ксилазина (Xyla®, Interchemie, the Netherlands) в дозе 10 мг/кг с последующей клинической оценкой глубины наркоза. По достижению глубокого уровня (III) хирургического наркоза в положении животного на спине осуществлялось вскрытие грудной клетки, выполнялся разрез в области правого предсердия размерами до 5 мм (для свободного истечения жидкости) с последующей пункцией левого желудочка и введением летальной дозы 10% раствора формальдегида.

После этого выполнялась декапитация и извлечение головного мозга животного с последующим помещением препарата в 10% нейтральный забуференный раствор формалина при 18°C на 24-48 часов. При вырезке полученного материала проводилась анатомическая ориентировка с выполнением анатомических срезов в аксиальной проекции с шагом в 2 мм. Материал был взят в работу тотально.

laser exposure, the optical fiber was left in the lesion area for 3 minutes to allow cooling (Fig. 2, Fig. 3A).

To assess the severity of laser-induced damage, histological examination was performed in all experimental groups. In addition, rats in Group 4, which were withdrawn from the experiment on day 30, underwent dynamic neuroimaging monitoring under the above-mentioned sedation using MRI in the T2 PROPELLER mode in the axial plane (Discovery MR750w 3.0T) immediately after surgery and on days 1, 3, 7, and 30, with the slice positioned at the level of the laser probe tip (Fig. 3B). The intensity of the MR signal and the area of the ablation lesion were measured using the standard measurement tools, including the closed polygon tool, in RadiAnt DICOM Viewer software, version 2021.2 (Medixant, Poland). The measurement results are presented in mm². The relative MR signal density was calculated relative to the signal density in the contralateral hemisphere (CH). The results were expressed in relative dimensionless units. The signal intensity of the CH was set as 1.0, and the relative signal intensity (RSI) in the lesion zones was calculated with respect to this reference.

For histological analysis, the animals were euthanized under deep anesthesia induced by intraperitoneal administration of tiletamine-zolazepam (Zoletil® 100, Virbac, France; 7.5 mg/kg) and

Гистологическая проводка выполнялась по стандартной схеме: обезживание в спиртах восходящей концентрации и заливка в парафин (оборудование Leica TP1020 и EG1150H). Срезы толщиной 3-4 мкм, полученные на ротационном микротоме Leica RM2125RT, окрашивались гематоксилином Майера и эозином (БиоВитрум, Россия).

Иммуногистохимическое исследование выполнялось на срезах толщиной 23 мкм по стандартному протоколу: депарафинизация, блокирование эндогенной пероксидазы 3% пероксидом водорода, тепловая демаскировка антигенов (Trilogy, Cell Marque; 97°C), блокирование 5% бычьим сывороточным альбумином. Срезы инкубировались с первичными антителами к GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок, маркер астроцитов; 1:100, Cell Marque) и CD68 (маркер макрофагов и микроглии; 1:150, Cell Marque) в течение 18 ч при 6°C, затем с вторичными антителами (EnVision Mouse или EnVision Rabbit) 30 мин при 37°C; докрашивание гематоксилином Майера, заключение под покровное стекло.

Полученные гистологические стеклопрепараты сканировались с применением сканирующего микроскопа Leica APERIO AT2 (Leica Biosystems, Germany) с программным обеспечением APERIO ScanScope Console (Aperio Imaging, USA). Полученные файлы в формате ScanScope Virtual Slide (Leica Microsystems, Germany), оценивались качественно и количественно врачом-патологоанатомом, специализирующимся в нейроморфологии.

Этическое заявление. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Сеченовского университета (протокол № 10-25 от 24.04.2025). Исследование было проведено в соответствии с положениями статьи 5 Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года), для лабораторных животных были обеспечены оптимальные условия содержания [7, 8]. В соответствии со статьёй 8 указанной конвенции были приняты меры для минимизации болевого синдрома, страданий или тревоги экспериментальных животных. Анестезию животных осуществляли внутрибрюшинным введением комбинации тилетамина-золазепам (Zoletil® 100, Virbac, France) в дозе 7,5 мг/кг и ксилазина (Xyla®, Interchemie, the Netherlands) в дозе 10 мг/кг [7].

Статистический анализ. Обработка статистических данных проводилась с помощью стандартных программ для работы с электронными таблицами Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA) и пакета прикладных программ для решения задач технических вычислений MATLAB 2020b (MathWorks, USA). Проверка нормальности распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку распределение в группах отличалось от нормального (малый размер выборки $n=5$), данные были представлены как медиана (Me) и межквартильный интервал [Q1; Q3]. Для множественных сравнений между четырьмя временными точками использовался непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, т.к. в 4-х временных точках были 4 разные группы животных. Для парных сравнений центральной и периферической зон использовался критерий Вилкоксона. Различия считались статистически значимыми при $p<0,05$ для парных сравнений и $p<0,0125$ для множественных сравнений (с учётом поправки Бонферрони для $df=3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании головного мозга крыс в разные периоды после лучевого воздействия с использованием методов нейрови-

xlazine (Xyla®, Interchemie, the Netherlands; 10 mg/kg). The depth of anesthesia was confirmed by clinical assessment prior to tissue collection. Once a deep level of surgical anesthesia, stage III, was achieved, the animal was placed in the supine position, the thoracic cavity was opened, and an incision up to 5 mm in size was made in the region of the right atrium to allow free outflow of fluid. This was followed by puncture of the left ventricle and administration of a lethal dose of 10% formaldehyde solution.

The animals were then decapitated, and the brain was removed and placed in 10% neutral buffered formalin at 18°C for 24-48 hours. During gross sampling of the material obtained, anatomical orientation was performed, and axial sections were obtained at 2-mm intervals. The entire material underwent further processing.

Histological processing was performed according to a standard protocol, including dehydration in graded ethanol solutions and paraffin embedding (Leica TP1020 and EG1150H systems). Sections 3-4 μ m thick were prepared using a Leica RM2125RT rotary microtome and stained with Mayer's hematoxylin and eosin (BioVitrum, Russia).

Immunohistochemical analysis was performed on 2-3 μ m-thick sections according to a standard protocol, including depa-
raffinization, blocking of endogenous peroxidase activity with 3% hydrogen peroxide, heat-induced antigen retrieval (Trilogy, Cell Marque; 97°C), and blocking with 5% bovine serum albumin. The sections were incubated with primary antibodies against GFAP (glial fibrillary acidic protein, an astrocyte marker; 1:100, Cell Marque) and CD68 (a marker of macrophages and microglia; 1:150, Cell Marque) for 18 h at 6°C, followed by incubation with secondary antibodies (EnVision Mouse or EnVision Rabbit) for 30 min at 37°C. The sections were then counterstained with Mayer's hematoxylin and coverslipped.

The obtained histological slides were scanned using a Leica APERIO AT2 scanning microscope (Leica Biosystems, Germany) with APERIO ScanScope Console software (Aperio Imaging, USA). The resulting ScanScope Virtual Slide files (Leica Microsystems, Germany) were assessed qualitatively and quantitatively by a pathologist specializing in neuromorphology.

Ethical statement. The study was approved by the Local Ethics Committee of Sechenov University (protocol No. 10-25 dated April 24, 2025). The study was conducted in accordance with the provisions of Article 5 of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, March 18, 1986). Optimal housing conditions were provided for the laboratory animals [7, 8]. In accordance with Article 8 of the Convention, measures were taken to minimize pain, suffering, and distress in the experimental animals. Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of tiletamine-zolazepam (Zoletil® 100, Virbac, France; 7.5 mg/kg) and xylazine (Xyla®, Interchemie, the Netherlands; 10 mg/kg) [7].

Statistical analysis. Statistical data processing was performed using standard spreadsheet software, Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA), and MATLAB 2020b software package for technical computing (MathWorks, USA). Normality of distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. Since the distributions in the groups differed from normality due to the small sample size ($n=5$), the data were presented as median (Me) and interquartile range [Q1; Q3]. For multiple comparisons among the four time points, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used, as four distinct groups of animals were analyzed at each time point. The

зуализации оценивались центральная зона, зона в области непосредственного воздействия тулиевого лазера и периферическая зона, располагающаяся в 3 мм от центральной, а также интактная зона противоположного полушария (рис. 4 A-D).

Показатели интенсивности МР-сигнала центральной и периферической зон поражения представлены в табл. 1

В 1-е сутки сразу после лазерной абляции на T2-взвешенном изображении центральная зона поражения была практически изоинтенсивна КП (ОИ 1,01 [0,84; 1,06]), тогда как ОИ сигнала периферической зоны была снижена – ОИ 0,79 [0,73; 0,95] (табл. 1, рис. 4 А, рис. 5, рис. 6). Интенсивность нормирована на КП, принятое за 1,0. ОИ сигнала центральной зоны статистически значимо нарастала по срокам наблюдения (критерий Краскела-Уоллиса): на 30-е сутки она была выше, чем на 1-е ($p<0,001$) и на 3-7-е сутки ($p<0,01$). При этом ОИ сигнала на периферии зоны поражения

Wilcoxon test was used for paired comparisons between the central and peripheral zones. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$ for paired comparisons and $p<0.0125$ for multiple comparisons, taking into account the Bonferroni correction for $df=3$.

RESULTS

When examining rat brain tissue at different time points after radiation exposure using neuroimaging methods, the central zone, corresponding to the area of direct thulium laser exposure, the peripheral zone located 3 mm from the central zone, and the intact zone of the CH were assessed (Fig. 4A-D).

The MR signal intensity values of the central and peripheral lesion zones are summarized in Table 1.

Таблица 1 Относительный показатель интенсивности МР-сигнала центральной и периферической зон поражения на 1-е (сразу после абляции), 3-и, 7-е, 30-е сутки

Table 1 Relative MR signal intensity in the central and peripheral lesion zones on day 1 (immediately after ablation), day 3, day 7, and day 30

Сутки Day	Интенсивность сигнала центральной зоны поражения Signal intensity in the central lesion zone	Интенсивность сигнала периферической зоны поражения (3 мм от центральной зоны) Signal intensity in the peripheral lesion zone, 3 mm from the central zone	p
1	1.01 [0.84; 1.06]	0.79 [0.73; 0.95]	=0.043
3	1.88 [1.70; 1.94]	0.93 [0.86; 1.11]	=0.043
7	1.92 [1.76; 1.98]	0.96 [0.89; 1.14]	=0.043
30	2.82 [2.68; 2.86]	0.88 [0.80; 1.11]	=0.043

Примечания: p – статистическая значимость различий показателей интенсивности сигнала между центральной и периферической зонами поражения (по критерию Вилкоксона)

Notes: p denotes the statistical significance of differences in signal intensity between the central and peripheral lesion zones (Wilcoxon test)

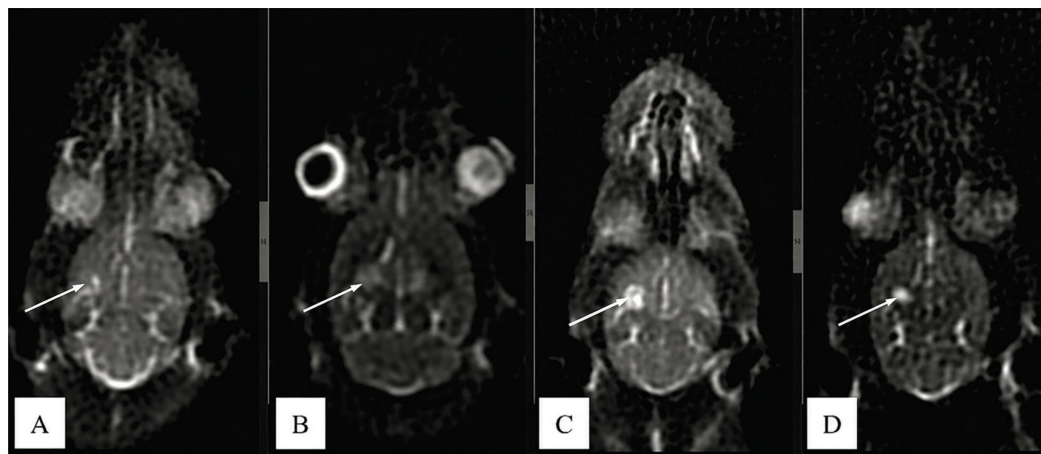


Рис. 4 МРТ в T2 PROPELLER режиме в аксиальной проекции (Discovery MR750w 3.0 Tл). Стрелкой указана зона абляции. (A) – сразу после лазерной абляции (1-е сутки): в центральной зоне определяется изоинтенсивный, по периферии – гипоинтенсивный МР-сигнал; (B, C) – 3-и, 7-е сутки: отмечается последовательное повышение интенсивности МР-сигнала в центральной зоне лазерного поражения, на T2-взвешенных изображениях до выражено гиперинтенсивного в сравнении с контрольным полушарием, а также умеренное увеличение его размеров без видимых изменений МР-сигнала в периферической зоне; (D) – 30-е сутки после поражения: визуализируется формирование кистозной полости с ровными, чёткими контурами, соответствующее участку кистозной дегенерации в области лазерного поражения

Fig. 4 MRI in the T2 PROPELLER mode in the axial plane (Discovery MR750w 3.0T). The arrow indicates the ablation site. (A) Immediately after laser ablation (day 1), the central region appears isointense, whereas the peripheral region exhibits a hypointense MR signal; (B, C) days 3 and 7: a progressive increase in MR signal intensity is observed in the central zone of laser-induced injury, becoming markedly hyperintense on T2-weighted images compared with the CH, as well as a moderate increase in lesion size without visible changes in MR signal in the peripheral zone; (D) day 30 after injury: formation of a cystic cavity with smooth, well-defined contours is visualized, corresponding to an area of cystic degeneration in the region of laser-induced injury

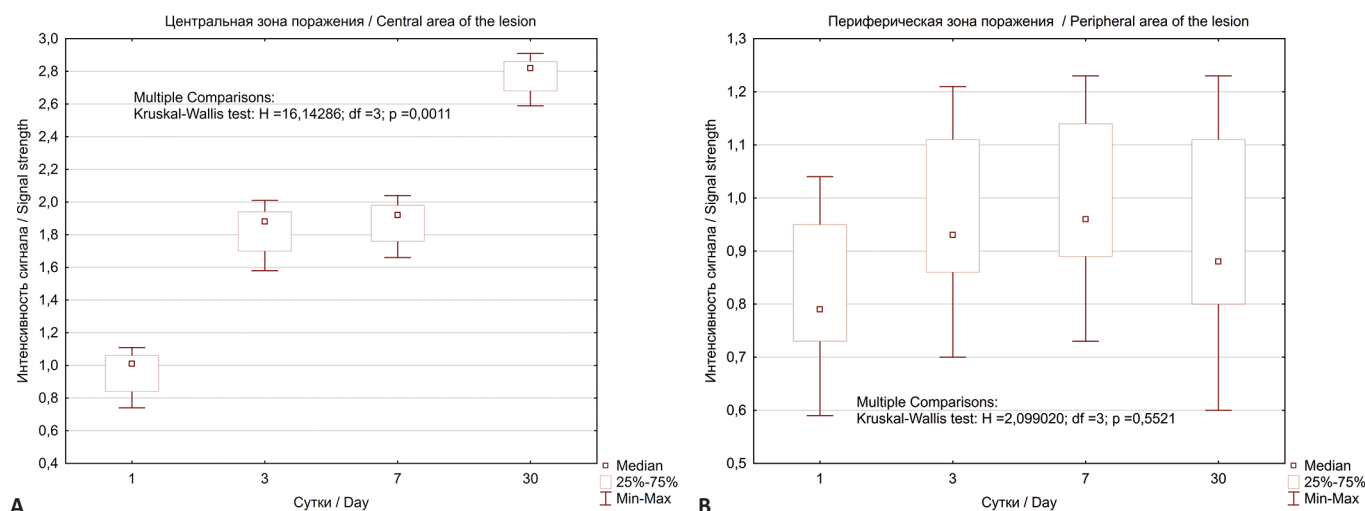


Рис. 5 А – интенсивность МР-сигнала центральной зоны поражения на 1-е, 3-и, 7-е и 30-е сутки; В – интенсивность МР-сигнала периферической зоны поражения на 1-е, 3-и, 7-е и 30-е сутки (статистическая значимость определялась по критерию Краскела-Уоллиса). Достигнутые уровни значимости приведены в табл. 1 и тексте раздела результатов

Fig. 5 А – MR signal intensity in the central lesion zone on days 1, 3, 7, and 30; В – MR signal intensity in the peripheral lesion zone on days 1, 3, 7, and 30. Statistical significance was determined using the Kruskal-Wallis test. The achieved levels of statistical significance are reported in Table 1 and in the Results section

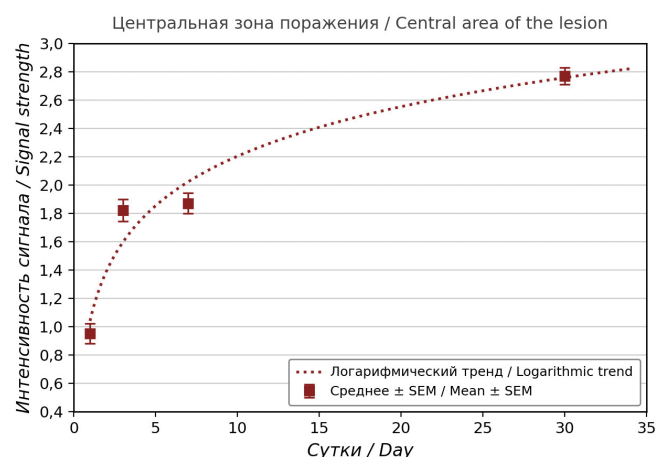
статистически значимо была слабее, чем в центре ($p=0,043$). Подобное соотношение интенсивности сигнала между центральной зоной поражения и периферической зоной наблюдалось и в последующие дни (на 3-и, 7-е и 30-е сутки).

Для сравнения интенсивности сигнала по суткам, ввиду использования различных животных, применялся критерий Краскела-Уоллиса (рис. 5А, В). Анализ показал, что в центральной зоне повреждения к 30-м суткам ОИ сигнала статистически значимо нарастала, в то время как в периферической зоне поражения наблюдалась лишь тенденция нарастания ОИ сигнала.

Анализ показал, что в центральной зоне повреждения к 30-м суткам ОИ сигнала статистически значимо нарастала, в то время как в периферической зоне поражения наблюдалась лишь тенденция нарастания ОИ сигнала.

Динамику интенсивности МР-сигнала на Т2-взвешенных изображениях аппроксимировали логарифмической линией тренда (рис. 6).

Изменение площади очага абляции, по данным МРТ головного мозга крысы, представлено на рис. 7.



Immediately after laser ablation (day 1), T2-weighted MRI demonstrated that the central lesion zone was almost isointense to the CH (RSI 1.01 [0.84-1.06]), whereas the peripheral lesion zone showed decreased signal intensity – 0.79 [0.73-0.95] (Table 1; Figs. 4A, 5, and 6). Signal intensity was normalized to that of the CH, which was assigned a value of 1.0. The RSI of the central zone increased significantly over the observation period (Kruskal-Wallis test): on day 30, it was higher than on day 1 ($p<0.001$) and on days 3 and 7 ($p<0.01$). At the same time, RSI in the peripheral part of the lesion was statistically significantly lower than in the central zone ($p=0.043$). A similar relationship in signal intensity between the central lesion zone and the peripheral zone was also observed on subsequent days, namely on days 3, 7, and 30.

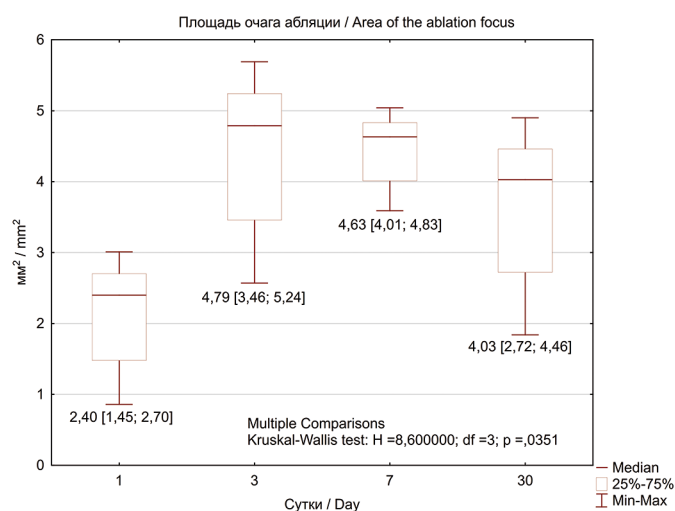
To compare signal intensity across time points, the Kruskal-Wallis test was used because different animals were examined at each time point (Fig. 5A, B).

The analysis showed that in the central injury zone, signal intensity increased statistically significantly by day 30, whereas in the peripheral lesion zone only a tendency toward increased signal intensity was observed.

The temporal dynamics of relative MR signal intensity on T2-weighted images were modeled using a logarithmic trendline (Fig. 6).

Рис. 6 Логарифмическая линия тренда интенсивности сигнала на Т2-взвешенном изображении. По оси абсцисс – сутки после абляции, по оси ординат – ОИ МР-сигнала в безразмерных единицах. Пунктирная линия представляет логарифмическую аппроксимацию динамики изменений. Предел логарифмической линии тренда в 3 раза выше, чем величина в КП

Fig. 6 Logarithmic trend line of RSI on T2-weighted images. The x-axis shows days after ablation, and the y-axis shows relative MR signal intensity in dimensionless units. The dashed line represents the logarithmic approximation of the dynamics of changes. The limit of the logarithmic trend line is three times higher than the value in the contralateral hemisphere



Как видно из рис. 7, площадь МР-изменений в этот период составила от 2,40 до 4,79 мм² с последующим уменьшением к 30-м суткам до 4,03 мм².

Макро- и микроструктура правого полушария головного мозга крысы сразу после проведения лазерной абляции представлена на рис. 8.

Рис. 7 Изменение площади очага абляции по данным МРТ головного мозга крысы на 1-е (сразу после лазерной абляции), 3-и, 7-е и 30-е сутки исследования (IV группа). По оси абсцисс – сутки после абляции, по оси ординат – площадь очага в мм². Статистически значимых различий размеров очага между сроками наблюдения не выявлено (критерий Краскела-Уоллиса, $p=0,0351$)

Fig. 7 Changes in the area of the ablation lesion according to MRI of the rat brain on day 1 (immediately after laser ablation), day 3, day 7, and day 30 of the study (Group 4). The x-axis shows days after ablation, and the y-axis shows the lesion area in mm². No statistically significant differences in lesion size were found between the observation time points (Kruskal-Wallis test, $p=0.0351$)

The change in the area of the ablation focus, according to MRI data of the rat brain, is shown in Fig. 7.

As follows from Fig. 7, the area of MRI-detected changes during this period ranged from 2.40 to 4.79 mm², followed by a decrease to 4.03 mm² by day 30.

Morphological examination of rats in Group 1, withdrawn from the experiment immediately after ablation, revealed signs of focal mechanical tissue damage in the probe placement zone and local hemorrhages represented by non-hemolyzed erythrocytes. Signs of pericellular edema were also observed, along with

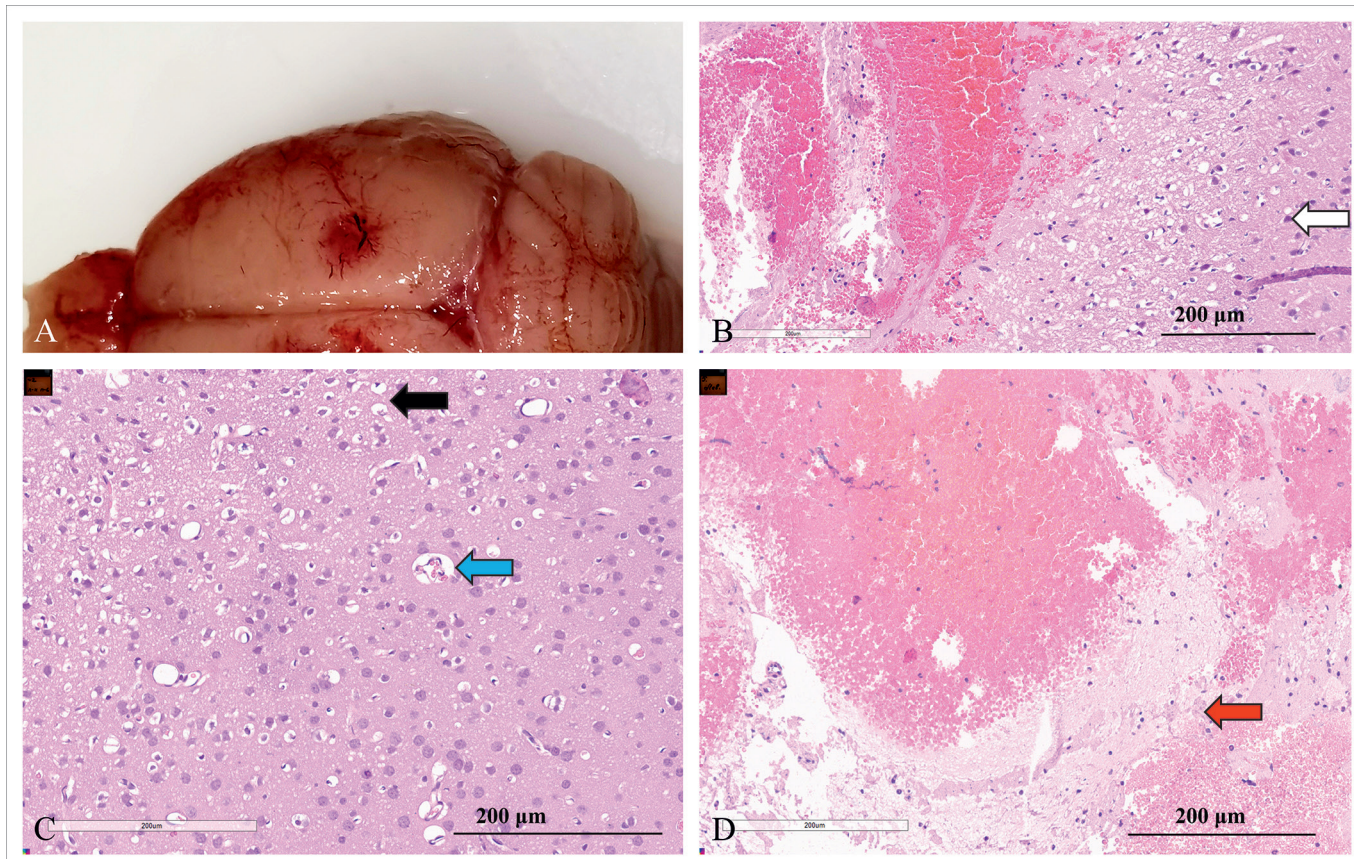


Рис. 8 Макро- и микроструктура правого полушария головного мозга крысы сразу после проведения лазерной абляции. (А) – макроскопическое исследование правого полушария головного мозга крысы сразу после лазерной абляции; (В-Д) – микроскопически наблюдаются явления перикеллюлярного отёка (чёрная стрелка), дистрофические изменения нейронов по тёмному типу (белая стрелка), крибры (синяя стрелка), некробиотические изменения и кровоизлияния (красная стрелка). Окраска гематоксилин-эозином, масштаб на изображении

Fig. 8 Macro- and microstructure of the right cerebral hemisphere of the rat immediately after laser ablation. (A) Macroscopic examination of the right cerebral hemisphere of the rat immediately after laser ablation; (B-D) microscopic findings include pericellular edema (black arrow), dark neuronal degenerative changes (white arrow), cribriform changes (blue arrow), necrobiotic changes, and hemorrhages (red arrow). Hematoxylin and eosin staining; scale bar shown in the image

Как видно из рис. 8, при морфологическом исследовании у крыс I группы, выведенных из эксперимента сразу после абляции, выявлялись признаки очаговых механических повреждений ткани в зоне установки зонда, локальные кровоизлияния, представленные негемолизированными эритроцитами. Имели место признаки перичеллюлярного отёка, а также умеренно выраженные ишемические изменения с формирующимися микронекрозами.

При проведении МРТ-исследования у крыс IV группы на 3-и и 7-е сутки наблюдалось увеличение ОИ МР-сигнала от центральной зоны повреждения относительно контралатерального полушария головного мозга. Интенсивность МР-сигнала в центральной зоне абляции на 3-и и 7-е сутки составила соответственно 1,88 [1,70; 1,94] и 1,92 [1,76; 1,98] ($p < 0,05$) в сравнении с интенсивностью МР-сигнала в первые сутки (рис. 4В, рис. 4С, рис. 5).

Изменения МР-сигнала в периферической зоне (3 мм от области воздействия лазерного излучения) характеризовались тенденцией к меньшей интенсивности в сравнении с контралатеральной стороной – 0,93 [0,86; 1,11] и 0,96 [0,89; 1,14] соответственно на 3-и и 7-е сутки после абляции. Однако эти изменения статистически не отличались от аналогичных изменений в 1-е сутки после воздействия (табл. 1, рис. 4В, рис. 4С, рис. 5).

Размер очага повреждения, по данным МРТ, на 3-и и 7-е сутки увеличился соответственно до 4,79 [3,46; 5,24] мм² и 4,63 [4,01; 4,83] мм², однако статистически значимых различий размеров очага между сроками наблюдения не выявлено (критерий Краскела-Уоллиса, $p = 0,0351$) (рис. 7).

Макро- и микроструктура правого полушария головного мозга крысы на 3-и сутки после проведения лазерной абляции представлена на рис. 9.

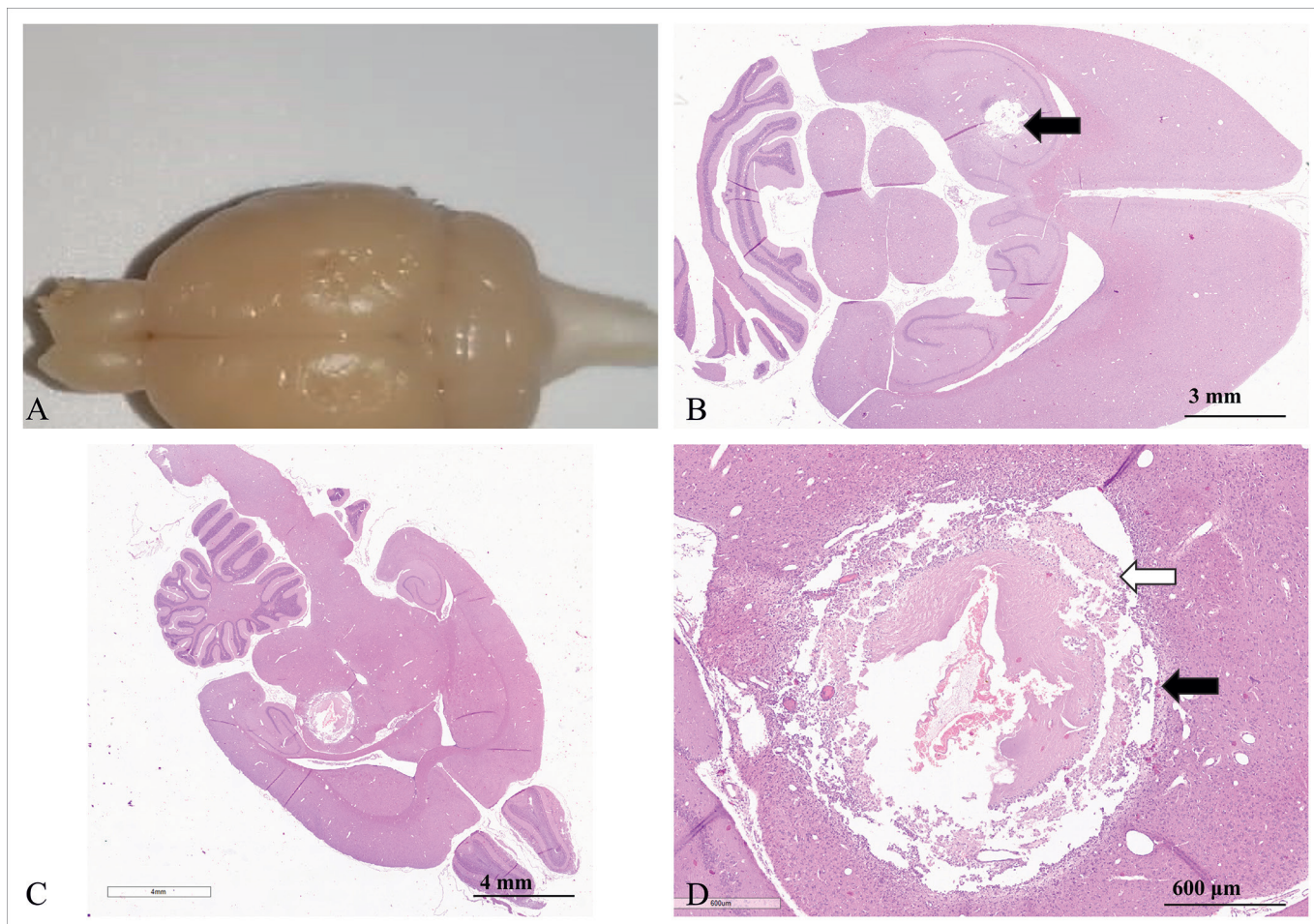
moderately pronounced ischemic changes with developing micro-necroses (Fig. 8).

MRI examination of rats in Group 4 on days 3 and 7 showed increased relative MR signal intensity in the central injury zone compared with the CH. MR signal intensity in the central ablation zone on days 3 and 7 was 1.88 [1.70; 1.94] and 1.92 [1.76; 1.98], respectively ($p < 0.05$ compared with MR signal intensity during the first 24 hours) (Table 1, Fig. 4B, Fig. 4C, Fig. 5).

Changes in MR signal in the peripheral zone, located 3 mm from the area of laser exposure, were characterized by a tendency toward lower intensity compared with the contralateral side: 0.93 [0.86; 1.11] and 0.96 [0.89; 1.14] on days 3 and 7 after ablation, respectively. However, these changes did not differ statistically from the corresponding changes observed on day 1 after exposure (Table 1, Fig. 4B, Fig. 4C, Fig. 5).

Рис. 9 Макро- и микроструктура правого полушария головного мозга крысы на 3-и сутки после проведения лазерной абляции. (А) – макроскопическое исследование правого полушария головного мозга крысы на 3-и сутки после лазерной абляции; (В-Д) – микроскопически наблюдаются явления резко выраженного отёка (чёрная стрелка) и крупные очаговые некрозы (белая стрелка). Окраска гематоксилин-эозином, масштаб на изображении

Fig. 9 Gross and microscopic features of the right cerebral hemisphere of a rat on day 3 following laser ablation. (A) Gross appearance of the right cerebral hemisphere on day 3 after laser ablation. (B-D) Histological examination demonstrated severe edema (black arrow) and large focal necrotic lesions (white arrow). Hematoxylin and eosin staining; scale bars are indicated in the images



Как видно из рис. 9, при морфологическом исследовании на 3-и сутки наблюдались резко выраженный отёк, очаги некроза, микрокистозная трансформация стромы, неравномерное сосудистое полнокровие, незначительная макрофагальная инфильтрация.

Макро- и микроструктура правого полушария головного мозга крысы на 7-е сутки после проведения лазерной абляции представлена на рис. 10.

Как видно из рис. 10, при морфологическом исследовании на 7-е сутки наблюдались очаги коагуляционного некроза, микрокистозная трансформация стромы, неравномерное сосудистое полнокровие, очаговые кровоизлияния. В центре постлучевой зоны имела место формирующаяся кистозная полость.

На 30-е сутки наблюдались максимальные изменения ОИ сигнала на T2-взвешенных изображениях, характеризующие формирование кистозной полости. Выявлялось инкапсулированное образование с чёткими ровными краями в центральной зоне поражения, ОИ сигнала которого превышала интенсивность КП в 2,82 раза ($p < 0,001$ в сравнении с интенсивностью МР-сигнала в первые сутки, $p < 0,01$ в сравнении с интенсивностью МР-сигнала на 3-7-е сутки). ОИ МР-сигнала в периферической зоне оставалась ниже, чем в КП и составляла относительно него 0,88 [0,80; 1,11] (табл. 1, рис. 4D, рис. 5). Динамика площади очага в этот период представлена на рис. 7.

По данным параметров ОИ центральной зоны построена логарифмическая линия тренда, отражающая увеличение интенсивности сигнала с течением времени.

Макро- и микроструктура правого полушария головного мозга крысы на 30-е сутки после проведения лазерной абляции представлена на рис. 11.

Как видно из рис. 11, при морфологическом исследовании на 30-е сутки определялась сформированная киста. Сохранились остаточные некротические фокусы с признаками их резорбции макрофагами (зернистыми шарами). Отмечались признаки неонангиогенеза и незначительно выраженная грануляционная ткань. Перифокально определялись глиоз, дистрофические микрокальцинаты, ишемическая дистрофия нейронов по тёмному и светлому типу, незначительный сателлитоз и нейронаофагия.

Таким образом, в динамике при морфологическом исследовании у крыс сразу после абляции в основном наблюдались признаки механического повреждения ткани головного мозга, а также умеренные ишемические изменения с явлениями отёка и формирующимися некрозами. На 3-и сутки доминировал резко выраженный отёк с крупными очагами некроза, отмечались ишемические повреждения нейронов по тёмному типу, а также периваскулярные кривилоры. На 7-е сутки в центре постлучевой зоны появлялась формирующаяся кистозная полость с умеренной макрофагальной инфильтрацией и гемосидерофагами, отёк и некрозы сохранялись. На 30-е сутки формировалась неистинная киста, отмечались ишемические изменения нейронов по светлому и тёмному типу, выявлялись выраженная макрофагальная инфильтрация с гемосидерофагами, признаки неонангиогенеза и незначительно выраженная грануляционная ткань, реактивный глиоз, что свидетельствует о начале репаративных процессов ткани головного мозга (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Современная нейрохирургия развивается в направлении миниинвазивных стереотаксических вмешательств, среди которых

According to MRI data, the size of the injury focus increased on days 3 and 7 to 4.79 [3.46; 5.24] mm² and 4.63 [4.01; 4.83] mm², respectively; however, no statistically significant differences in lesion size were found between the observation time points (Kruskal-Wallis test, $p = 0.0351$) (Fig. 7).

Morphological examination on day 3 revealed pronounced edema, foci of necrosis, microcystic transformation of the stroma, uneven vascular congestion, and mild macrophage infiltration (Fig. 9).

Morphological examination on day 7 revealed foci of coagulative necrosis, microcystic transformation of the stroma, uneven vascular congestion, and focal hemorrhages. A developing cystic cavity was present in the center of the post-radiation zone (Fig. 10).

On day 30, the most pronounced changes in RSI on T2-weighted images were observed, corresponding to the formation of a cystic cavity. An encapsulated lesion with well-defined, smooth margins was identified in the central lesion zone. Its RSI was 2.82-fold higher than that of the CH ($p < 0.001$ compared with the MR signal intensity on day 1 and $p < 0.01$ compared with that on days 3-7). The RSI of the peripheral zone remained lower than that of the CH, amounting to 0.88 [0.80-1.11] relative to the reference value (Table 1; Figs. 4D and 5). The temporal changes in lesion area during this period are presented in Fig. 7.

Based on the parameters of relative intensity in the central zone, a logarithmic trend line was constructed, reflecting an increase in signal intensity over time.

As shown in Fig. 11, a well-formed cyst was identified on morphological examination at day 30. Residual necrotic foci showing macrophage-mediated resorption (gitter cells) were still present. Signs of neoangiogenesis and a mildly developed granulation tissue were also noted. In the perifocal region, gliosis, dystrophic microcalcifications, ischemic neuronal changes of both dark and light types, mild satellitosis, and neuronophagia were observed.

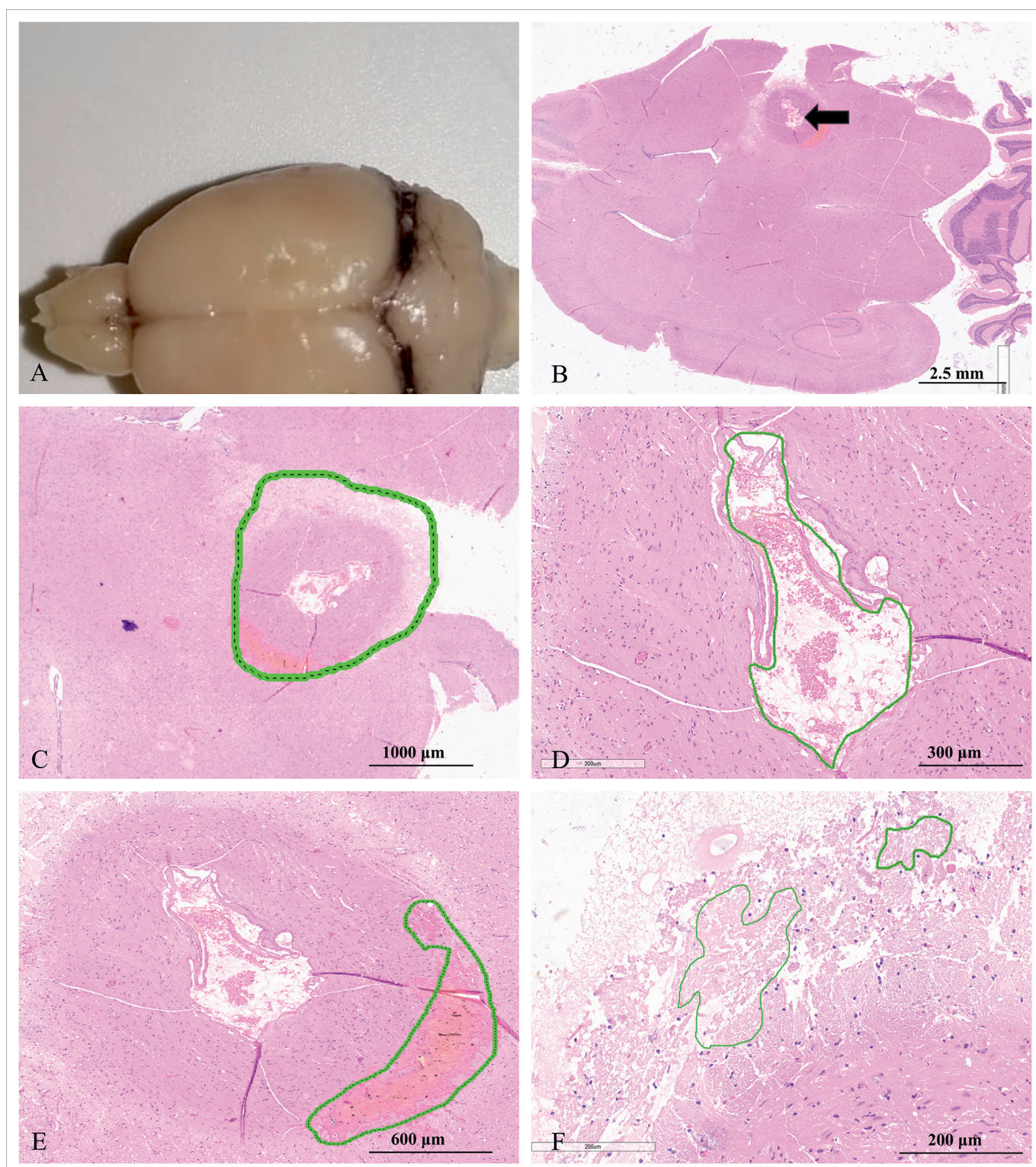
Thus, over time, morphological examination of rats immediately after ablation mainly revealed signs of mechanical damage to brain tissue, as well as moderate ischemic changes accompanied by edema and developing necroses. On day 3, pronounced edema with large foci of necrosis predominated; dark-type ischemic neuronal damage and perivascular cribriform changes were also observed. On day 7, a developing cystic cavity appeared in the center of the post-radiation zone, accompanied by moderate macrophage infiltration and hemosiderophages, while edema and necroses persisted. On day 30, a pseudocyst had formed; light- and dark-type ischemic neuronal changes were noted, along with pronounced macrophage infiltration with hemosiderophages, signs of neoangiogenesis, mildly expressed granulation tissue, and reactive gliosis, indicating the onset of reparative processes in brain tissue (Table 3).

DISCUSSION

Modern neurosurgery is increasingly focused on minimally invasive stereotactic procedures, among which laser interstitial thermal therapy is gaining growing clinical importance [1, 9, 12]. Despite accumulated clinical experience, experimental characterization of the temporal dynamics of tissue response to thulium fiber laser exposure remains limited, which defined the aim of the present study: to compare neuroimaging and morphological findings at different time points after ablation.

Рис. 10 Макро- и микроструктура правого полушария головного мозга крысы на 7-е сутки после проведения лазерной абляции. (А) – макроскопическое исследование полушария головного мозга крысы на 7-е сутки после лазерной абляции; (В-Е) – микроскопические изменения; (В) – зона поражения, преимущественно представленная некрозом и отёком (чёрная стрелка); (С) – общая площадь поражения лазерной установкой; (D) – общая площадь формирующейся кистозной полости с умеренной макрофагальной инфильтрацией; (Е) – общая площадь зоны кровоизлияния; (F) – очаговые некрозы. Окраска гематоксилин-эозином, масштаб на изображении

Fig. 10 Macro- and microstructure of the right cerebral hemisphere of the rat on day 7 after laser ablation. (A) Macroscopic examination of the cerebral hemisphere of the rat on day 7 after laser ablation; (B-F) microscopic changes; (B) lesion zone predominantly represented by necrosis and edema (black arrow); (C) total area of laser-induced injury; (D) total area of the developing cystic cavity with moderate macrophage infiltration; (E) total area of hemorrhage; (F) focal necroses. Hematoxylin and eosin staining; scale bar shown in the image



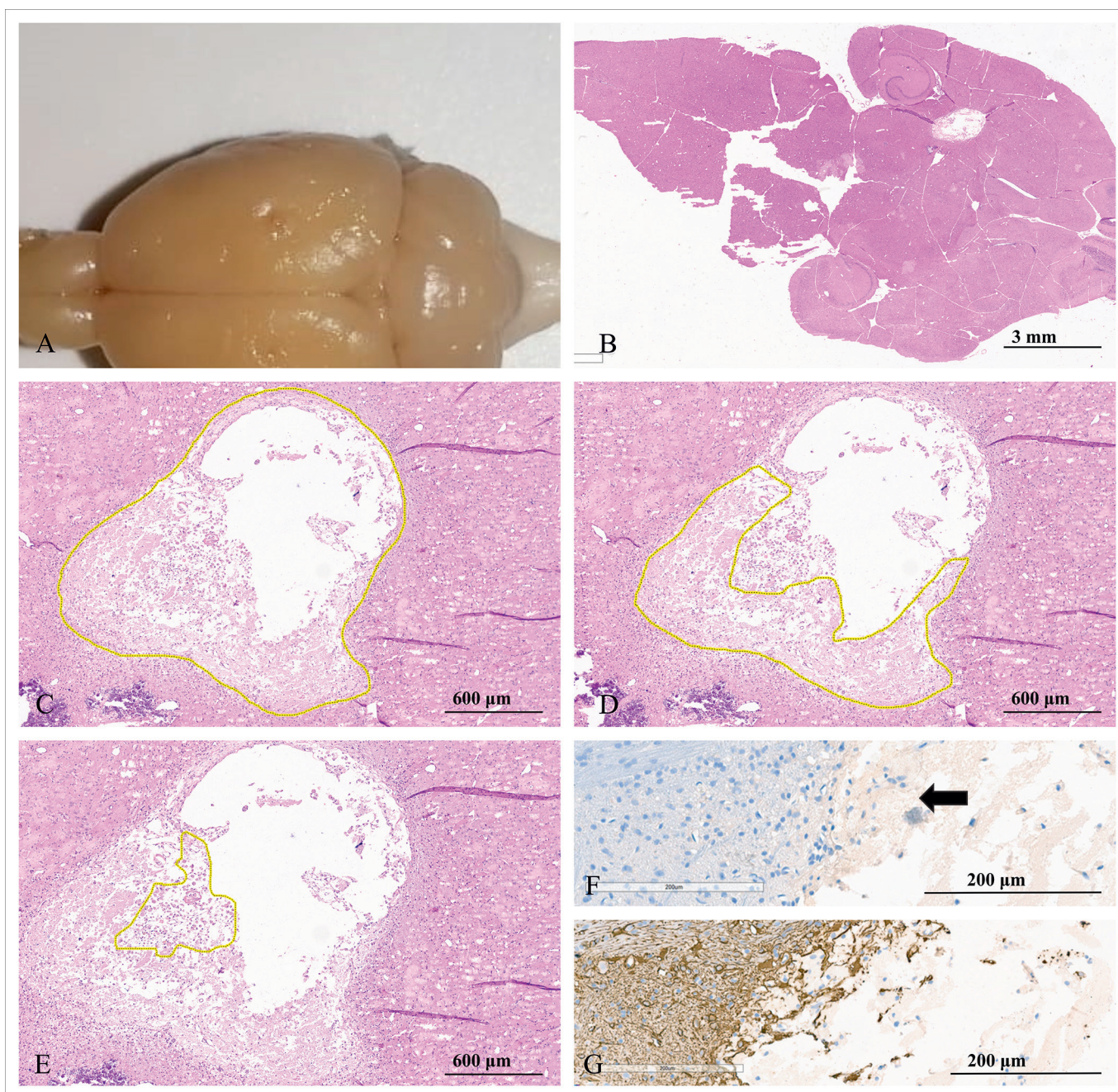


Рис. 11 Макро- и микроструктура правого полушария головного мозга крысы на 30-е сутки после проведения лазерной абляции. (A) – макроскопическое исследование правого полушария головного мозга крысы на 30-е сутки после лазерной абляции; (B) – микроскопическое исследование правого полушария головного мозга крысы на 30-е сутки после лазерной абляции; (C) – общая площадь зоны лазерного поражения; (D) – зона некроза; (E) – зона макрофагальной инфильтрации; (F) – постлучевая зона на границе с сохранной паренхимой: слабая диффузная CD68-реактивность матрикса и единичные рассеянные CD68-положительные клетки (макрофаги, активированная микроглия); чёрной стрелкой указана краевая зона очага; (G) – распределение GFAP по краю постлучевой зоны (реактивный глиоз) как отражение репаративных процессов. Панели B–E – окраска гематоксилин-эозином; панели F и G – иммуногистохимическое окрашивание, CD68 и GFAP соответственно. Масштаб указан на изображениях

Fig. 11 Gross and microscopic features of the right cerebral hemisphere of a rat on day 30 after laser ablation. (A) Gross examination of the right cerebral hemisphere on day 30 after laser ablation. (B) Microscopic examination of the right cerebral hemisphere on day 30 after laser ablation. (C) Overall area of the laser-induced lesion. (D) Necrotic zone. (E) Zone of macrophage infiltration. (F) Post-irradiation zone at the interface with the preserved parenchyma, showing weak diffuse CD68 immunoreactivity of the extracellular matrix and scattered CD68-positive cells (macrophages and activated microglia); the black arrow indicates the peripheral margin of the lesion. (G) GFAP distribution along the border of the post-irradiation zone (reactive gliosis), reflecting reparative processes. Panels B–E: hematoxylin and eosin staining; panels F and G: immunohistochemical staining for CD68 and GFAP, respectively. Scale bars are indicated in the images

Таблица 3 Динамика морфологической картины на 1-е (сразу после абляции), 3-и, 7-е, 30-е сутки исследования**Table 3** Dynamics of morphological changes on day 1 (immediately after ablation), day 3, day 7, and day 30 of the study

Гистологические элементы Histological features	1-е сутки Day 1	3-и сутки Day 3	7-е сутки Day 7	30-е сутки Day 30
Признаки механического повреждения ткани головного мозга Signs of mechanical damage to brain tissue	+++	++	+	
Микрововоизлияния Microhemorrhages	+++	++	+	
Отек Edema	++	+++	++	+
Ишемические повреждения нейронов Ischemic neuronal damage	++	++	++	+
Некроз Necrosis	+++	+++	++	+
Микрокистозная трансформация стромы Microcystic transformation of the stroma	++	+++	++	++
Образование неистинной кисты Formation of a pseudocyst			+	++
Макрофагальная инфильтрация Macrophage infiltration		+	+++	++
Признаки неоангиогенеза Signs of neoangiogenesis			++	++
Реактивный глиоз Reactive gliosis				++

Примечание: + незначительная степень; ++ умеренная степень; +++ выраженная степень

Note: + mild degree; ++ moderate degree; +++ pronounced degree

лазерная интерстициальная термотерапия занимает всё более значимое место [1, 9, 12]. Несмотря на накопленный клинический опыт, экспериментальная характеристика динамики тканевого ответа на воздействие тулиевого волоконного лазера остаётся ограниченной, что и определило задачу настоящего исследования: сопоставить нейровизуализационную и морфологическую картину в различные сроки после абляции.

Фототермический эффект лазерного излучения определяется оптическими и теплофизическими свойствами ткани и зависит от длины волны, мощности и продолжительности воздействия: в зависимости от этих параметров развиваются коагуляция, испарение или карбонизация [13, 14]. В отличие от непрерывноволновых Nd:YAG и диодных лазеров, формирующих резкие температурные градиенты и разрывающий эффект на границе абляции [13, 15], тулиевый волоконный лазер с длиной волны около 2000 нм поглощается преимущественно водой ткани, что обеспечивает плавное иссечение и испарение с выраженным коагуляционным эффектом [5, 6, 16]. В настоящей работе использован непрерывноволновой тулиевый волоконный лазер с длиной волны 2010 нм [16].

Сразу после абляции центральная зона поражения была практически изоинтенсивна КП на T2-взвешенных изображениях, что соответствовало слабой выраженности структурных изменений в этот срок: гистологически выявлялись перичеллюлярный и периваскулярный отёк и ишемические изменения с формирующимися микронекрозами. Подобный характер ранних изменений после лазерной термодеструкции в виде участков некроза и некробиоза является классическим и описан ранее [17]. Термическое лазерное воздействие имеет отсроченный компонент, при котором выраженность деструктивных изменений нарастает в течение 24-48 часов с сохранением нативной структуры в периферических зонах [18]: в нашей работе этот отсроченный эффект был подтверждён как нейровизуализационно, так и гистологически.

The photothermal effect of laser radiation is determined by the optical and thermophysical properties of the tissue and depends on wavelength, power, and duration of exposure; depending on these parameters, coagulation, vaporization, or carbonization may occur [13, 14]. In contrast to continuous-wave Nd:YAG and diode lasers, which generate steep thermal gradients and a disruptive effect at the ablation boundary [13, 15], thulium fiber lasers with a wavelength of approximately 2000 nm are predominantly absorbed by tissue water, enabling gradual dissection and vaporization with a pronounced coagulative effect [5, 6, 16]. In the present study, a continuous-wave thulium fiber laser operating at 2010 nm was used [16].

Immediately after ablation, the central lesion zone was nearly isointense with the CH on T2-weighted images, consistent with relatively mild structural changes at this stage. Histologically, pericellular and perivascular edema, along with ischemic changes and developing micro-necroses, were observed. This pattern of early changes following laser thermal destruction, characterized by necrotic and necrobiotic areas, is well established and has been previously described [17]. Laser thermal injury has a delayed component, with progressive development of destructive changes over 24-48 hours and relative preservation of native structure in peripheral zones [18]; in the present study, this delayed effect was confirmed both by neuroimaging and histological findings.

On days 3-7, the central zone demonstrated a hyperintense signal, which corresponded morphologically to large necrotic foci, marked pericellular and perivascular edema, ischemic neuronal degeneration of the dark type, vascular congestion, and focal hemorrhages. A cystic cavity with moderate macrophage infiltration formed in the center of the post-irradiation zone. A similar sequence of tissue response – formation of a coagulative necrosis

К 3-7-м суткам центральная зона приобретала гиперинтенсивный сигнал, что морфологически соответствовало крупным очагам некроза, выраженному перичеселлярному и периваскулярному отёку, дистрофическим изменениям нейронов по тёмному типу, сосудистому полнокровию и очагам кровоизлияний; в центре постлучевой зоны формировалась кистозная полость с умеренной макрофагальной инфильтрацией. Сходную последовательность тканевого ответа – формирование зоны коагуляционного некроза с краевой грануляционной тканью и последующим кистообразованием – отмечали в экспериментальных моделях лазерного воздействия на головной мозг с применением CO₂-лазера [10] и в модели лазер-индуцированного повреждения с гистологической и поведенческой оценкой [11].

В период с 7-х по 30-е сутки, по данным нейровизуализации, отмечалась тенденция к уменьшению размеров очага с его кистозной трансформацией. На микроскопическом уровне этому соответствовали формирование неистинной кисты, резорбция коагуляционного некроза макрофагами (зернистыми шарами), уменьшение перифокального отёка, а также перифокальные реактивные изменения с умеренным глиозом, неоангиогенезом и грануляционной тканью в виде демаркационной линии. Дополнительно выявлялись дистрофические изменения нейронов по тёмному и светлому типу. Чёткая отграниченность зоны воздействия при минимальном повреждении окружающей паренхимы согласуется с представлениями о селективности тулиевого лазерного воздействия, обусловленной высоким водопоглощением на данной длине волны [5, 6].

Ограничениями настоящего исследования являются: небольшой объём групп (по 5 животных), что ограничивает статистическую мощность; описательный характер гистологической оценки – полуколичественный балльный анализ морфологических признаков не проводился, в связи с чем сопоставление нейровизуализационной и гистологической картины является качественным, а не статистически подтверждённой корреляцией.

С учётом тотального некроза и лизиса зоны воздействия лазерной энергии при минимальном повреждении окружающей здоровой ткани тулиевый волоконный лазер представляет интерес для дальнейшего изучения и применения в нейрохирургической практике [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие 2010-нм тулиевого волоконного лазера на ткань головного мозга крысы сопровождается последовательной сменой морфологических фаз: от раннего ишемически-некротического повреждения с отёком в первые сутки, через формирование зоны коагуляционного некроза с кистозной полостью к 7-м суткам, до отграниченной неистинной кисты с признаками репарации – резорбцией некроза, умеренным глиозом и неоангиогенезом – к 30-м суткам. Эти фазы сопровождались закономерной динамикой нейровизуализационной картины: ОИ МР-сигнала центральной зоны статистически значимо нарастала по срокам наблюдения (критерий Краскела-Уоллиса), достигая максимума к 30-м суткам и отражая организацию процесса с формированием отграниченной кисты.

Локальная отграниченность зоны воздействия при минимальном повреждении окружающей паренхимы свидетельствует о контролируемом характере туливой лазерной абляции. С практической точки зрения период наибольшей выраженности вазогенной реакции приходится на 3-7-е сутки, что целесообразно учитывать при планировании контрольной МРТ-диагностики.

zone with peripheral granulation tissue and subsequent cyst formation – has been reported in experimental models of laser brain exposure using CO₂ lasers [10] and in models of laser-induced injury with histological and behavioral assessment [11].

Between days 7 and 30, neuroimaging demonstrated a tendency toward reduction in lesion size with cystic transformation. Microscopically, this corresponded to the formation of a pseudocyst, resorption of coagulative necrosis by macrophages (gitter cells), reduction of perifocal edema, and perifocal reactive changes including moderate gliosis, neoangiogenesis, and granulation tissue forming a demarcation zone. In addition, ischemic neuronal alterations of both dark and light types were observed. The well-demarcated nature of the lesion, with minimal damage to the surrounding parenchyma, is consistent with the selective nature of thulium laser exposure, attributable to high water absorption at this wavelength [5, 6].

Limitations of the present study include the small sample size in each group (n=5 animals), which reduces statistical power. In addition, the histological evaluation was descriptive; no semi-quantitative scoring of morphological features was performed. Therefore, the comparison between neuroimaging and histological findings represents a qualitative association rather than a statistically validated correlation.

Considering the development of total necrosis and lysis within the laser-irradiated zone with minimal damage to the surrounding healthy tissue, the thulium fiber laser remains of interest for further investigation and potential application in neurosurgical practice [19].

CONCLUSION

Exposure of rat brain tissue to a 2010-nm thulium fiber laser is accompanied by a sequential progression of morphological phases: from early ischemic-necrotic injury with edema within the first day, through the formation of a coagulative necrosis zone with a cystic cavity by day 7, to a well-demarcated pseudocyst with signs of tissue repair – including necrosis resorption, moderate gliosis, and neoangiogenesis – by day 30. These phases were accompanied by a corresponding temporal evolution of neuroimaging findings, with relative MR signal intensity in the central lesion zone increasing significantly over time (Kruskal-Wallis test), reaching a maximum at day 30 and reflecting lesion organization with pseudocyst formation.

The localized and well-circumscribed nature of the lesion with minimal damage to the surrounding parenchyma indicates the controlled character of thulium fiber laser ablation. From a practical perspective, the most pronounced vasogenic response occurs between days 3-7, which should be taken into account when scheduling follow-up MRI examinations.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nosova K, Quiceno E, Hussein A, Bozinov O, Nakaji P. History of ablation therapies in neurosurgery. *Neurosurg Clin N Am*. 2023;34:193-8. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2022.12.002>
2. Vellayappan B, Lim-Fat MJ, Kotecha R, De Salles A, Fariselli L, Levivier M, et al. A systematic review informing the management of symptomatic brain radiation necrosis after stereotactic radiosurgery and International Stereotactic Radiosurgery Society Recommendations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2024;118(1):14-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2023.07.015>
3. Rademacher AF, Fadel HA, Pawloski JA. Laser interstitial thermal therapy for intra-axial brain tumors: Everything the neuroradiologist should know. *Am J Neuroradiol*. 2025;46(4):666-74. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A8427>
4. Munoz-Casabella A, Alvi MA, Rahman M, Burns TC, Brown DA. Laser interstitial thermal therapy for recurrent glioblastoma: Pooled analyses of available literature. *World Neurosurg*. 2021;153:91-7. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2021.05.114>
5. Tunc B, Gulsoy M. Stereotaxic laser brain surgery with 1940-nm Tm: Fiber laser: An in vivo study. *Lasers Surg Med*. 2019;51:643-52. <https://doi.org/10.1002/lsm.23070>
6. Passacantilli E, Antonelli M, D'Amico A, Delfinis CP, Anichini G, Lenzi J, et al. Neurosurgical applications of the 2-μm thulium laser: Histological evaluation of meningiomas in comparison to bipolar forceps and an ultrasonic aspirator. *Photomed Laser Surg*. 2012;30:286-92. <https://doi.org/10.1089/pho.2011.3137>
7. Cicero L, Fazzotta S, Palumbo VD, Cassata G, Lo Monte AI. Anesthesia protocols in laboratory animals used for scientific purposes. *Acta Biomed*. 2018;89:337-42. <https://doi.org/10.23750/abm.v89i3.5824>
8. Rozemond H. Laboratory animal protection: The European Convention and the Dutch Act. *Vet Q*. 1986;8:346-9. <https://doi.org/10.1080/01652176.1986.9694067>
9. Gurses ME, Lu VM, Gecici NN, Gökalp E, Shah KH, Metzler AR, et al. Laser interstitial thermal therapy in neurosurgery: A single-surgeon experience of 313 patients. *J Neurosurg*. 2024;141:1281-91. <https://doi.org/10.3171/2024.3.JNS245>

REFERENCES

10. Colasanti R, Giannoni L, Dallari S, Liverotti V, Aiudi D, Di Rienzo A, et al. Application of a scanner-assisted carbon dioxide laser system for neurosurgery. *World Neurosurg*. 2021;153:250-8. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2021.06.085>
11. Shabani Z, Farhoudi M, Rahbarghazi R, Karimipour M, Mehrad H. Cellular, histological, and behavioral pathological alterations associated with the mouse model of photothrombotic ischemic stroke. *J Chem Neuroanat*. 2023;130:102261. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2023.102261>
12. Buttrick S, Komotar RJ. Introduction for laser interstitial thermal therapy (LITT) in neurosurgery supplement. *Neurosurgery*. 2016;79:S1-S2. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000001437>
13. Campos Paiva AL, Vitorino Araujo JL, Lovato RM, Esteves Veiga JC. Safety and efficacy of 980 nm diode laser for brain tumor microsurgery – A pioneer case series. *World Neurosurg*. 2021;146:461-6. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.10.113>
14. Kim MJ, Kim MH, Kim S, Lee JJ, Kim HJ. Near-infrared laser diode mitigates Aβ1-42-induced neurodegeneration in cortical neurons. *J Photochem Photobiol B*. 2024;259:113021. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.113021>
15. Grossman R, Strauss I. Laser interstitial thermal therapy (LITT) in neurosurgery. *Harefuah*. 2023;162(2):110-5.
16. Andrés Sanz JA, Marrone S, Cacciotti G, Carpineta E, Scavo CG, Roperto R, et al. Safety and efficacy of 2-μm handheld thulium laser during microsurgical resection of supratentorial and infratentorial meningiomas: Experience of a single center. *Front Surg*. 2022;9:1021019. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2022.1021019>
17. Thunshelle C, Hamblin MR. Transcranial low-level laser (light) therapy for brain injury. *Photomed Laser Surg*. 2016;34:587-98. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4051>
18. Chen C, Lee I, Tatsui C, Elder T, Sloan AE. Laser interstitial thermotherapy (LITT) for the treatment of tumors of the brain and spine: A brief review. *J Neurooncol*. 2021;151:429-42. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03652-z>

 СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Суфианов Ринат Альбертович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры нейрохирургии, Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского; врач-нейрохирург отделения нейроонкологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина; врач-нейрохирург, Федеральный центр нейрохирургии
Researcher ID: ABC-8823-2021
Scopus ID: 56001416700
ORCID ID: 0000-0003-4031-0540
SPIN-код: 1204-2994
Author ID: 792245
E-mail: rinat.sufianov@gmail.com

Дыдыкин Сергей Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Researcher ID: B-4168-2018
Scopus ID: 57224563427
ORCID ID: 0000-0002-1273-0356
SPIN-код: 7385-3194
Author ID: 3162253
E-mail: dydykin_s_s@staff.sechenov.ru

Маматханов Магомед Рамазанович, доктор медицинских наук, врач-нейрохирург, Детская городская клиническая больница им. З.А. Башляева Департамента здравоохранения г. Москвы
Scopus ID: 57232228900
ORCID ID: 0000-0001-7170-7415
SPIN-код: 7426-2245
Author ID: 703398
E-mail: magomedniisp@mail.ru

 AUTHORS' INFORMATION

Sufianov Rinat Albertovich, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Neurosurgery, Russian Scientific Center of Surgery named after Academician B.V. Petrovsky; Neurosurgeon, Department of Neurooncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Neurosurgeon, Federal Center of Neurosurgery
Researcher ID: ABC-8823-2021
Scopus ID: 56001416700
ORCID ID: 0000-0003-4031-0540
SPIN: 1204-2994
Author ID: 792245
E-mail: rinat.sufianov@gmail.com

Dydykin Sergey Sergeevich, Doctor of Medical Sciences, Full Professor, Head of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
Researcher ID: B-4168-2018
Scopus ID: 57224563427
ORCID ID: 0000-0002-1273-0356
SPIN: 7385-3194
Author ID: 3162253
E-mail: dydykin_s_s@staff.sechenov.ru

Mamatkhanov Magomed Ramazanovich, Doctor of Medical Sciences, Neurosurgeon, Children's City Clinical Hospital named after Z.A. Bashlyeva, Moscow Department of Health
Scopus ID: 57232228900
ORCID ID: 0000-0001-7170-7415
SPIN: 7426-2245
Author ID: 703398
E-mail: magomedniisp@mail.ru

Мурзаева Джамиля Адильхановна, врач-патологоанатом, Федеральный центр нейрохирургии
 Researcher ID: AAU-4058-2020
 Scopus ID: 58486559700
 ORCID ID: 0000-0002-2801-4485
 SPIN-код: 9618-6709
 Author ID: 937283
 E-mail: dzhamilay22@mail.ru

Гарифуллина Наргиза Аскатовна, нейрохирург отделения функциональной нейрохирургии, Федеральный центр нейрохирургии; ассистент кафедры фармакологии, Тюменский государственный медицинский университет

Researcher ID: NLN-5534-2025
 Scopus ID: 58859271100
 ORCID ID: 0000-0001-6918-5339
 SPIN-код: 9439-6515
 Author ID: 1258161
 E-mail: garifullina.nargiza17@yandex.ru

Суфианов Альберт Акрамович, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нейрохирургии, Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского; директор Учебно-научного института нейрохирургии, Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы; главный врач, Федеральный центр нейрохирургии
 Scopus ID: 6603558501
 ORCID ID: 0000-0001-7580-0385
 SPIN-код: 1722-0448
 Author ID: 446102
 E-mail: Sufianov@gmail.com

Информация об источнике поддержки в виде грантов, оборудования, лекарственных препаратов

Финансовой поддержки со стороны компаний-производителей лекарственных препаратов и медицинского оборудования авторы не получали

Конфликт интересов: отсутствуют

✉ АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Суфианов Ринат Альбертович

кандидат медицинских наук, доцент кафедры нейрохирургии, Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского; врач-нейрохирург отделения нейроонкологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина; врач-нейрохирург, Федеральный центр нейрохирургии

625062, Российская Федерация, г. Тюмень, ул. 4 км Червишевского тракта, 5
 Тел.: +7 (926) 3805235
 E-mail: rinat.sufianov@gmail.com

ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка концепции и дизайна исследования: CPA, ДСС, САА
 Сбор материала: ММР, МДА, ГНА
 Статистическая обработка данных: ММР, МДА, ГНА
 Анализ полученных данных: CPA, ДСС, ММР, МДА, ГНА, САА
 Подготовка текста: ММР, МДА, ГНА
 Редактирование: CPA, ДСС, САА
 Общая ответственность: CPA, ДСС, ММР, МДА, ГНА, САА

Поступила 29.05.25
 Принята в печать 28.05.26

Murzaeva Dzhamilya Adilkhanovna, Pathologist, Federal Center of Neurosurgery
 Researcher ID: AAU-4058-2020
 Scopus ID: 58486559700
 ORCID ID: 0000-0002-2801-4485
 SPIN: 9618-6709
 Author ID: 937283
 E-mail: dzhamilay22@mail.ru

Garifullina Nargiza Askatovna, Neurosurgeon, Department of Functional Neurosurgery, Federal Center for Neurosurgery; Assistant Professor, Department of Pharmacology, Tyumen State Medical University

Researcher ID: NLN-5534-2025
 Scopus ID: 58859271100
 ORCID ID: 0000-0001-6918-5339
 SPIN: 9439-6515
 Author ID: 1258161
 E-mail: garifullina.nargiza17@yandex.ru

Sufianov Albert Akramovich, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Full Professor, Head of the Department of Neurosurgery, Russian Scientific Center of Surgery named after Academician B.V. Petrovsky; Director of the Educational and Scientific Institute of Neurosurgery, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia; Chief Physician, Federal Center for Neurosurgery
 Scopus ID: 6603558501
 ORCID ID: 0000-0001-7580-0385
 SPIN: 1722-0448
 Author ID: 446102
 E-mail: Sufianov@gmail.com

Information about support in the form of grants, equipment, medications

The authors did not receive financial support from manufacturers of medicines and medical equipment

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest

✉ ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Sufianov Rinat Albertovich

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Neurosurgery, Russian Scientific Center of Surgery named after Academician B.V. Petrovsky; Neurosurgeon, Department of Neurooncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Neurosurgeon, Federal Center of Neurosurgery

625062, Russian Federation, Tyumen, 4 km Chervishevskogo trakta str., 5
 Tel.: +7 (926) 3805235
 E-mail: rinat.sufianov@gmail.com

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: SRA, DSS, SAA
 Data collection: MMR, MDA, GNA
 Statistical analysis: MMR, MDA, GNA
 Analysis and interpretation: SRA, DSS, MMR, MDA, GNA, SAA
 Writing the article: MMR, MDA, GNA
 Critical revision of the article: SRA, DSS, SAA
 Overall responsibility: SRA, DSS, MMR, MDA, GNA, SAA

Submitted 29.05.25
 Accepted 28.05.26