

На правах рукописи

Шоронова Анастасия Юрьевна

**СТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ НЕОКОРТЕКСА И
ГИПОКАМПА БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-
МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ**

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2024

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Акулинин Виктор Александрович – доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Ишунина Татьяна Александровна – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России

Светлик Михаил Васильевич – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры физиологии человека и животных ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Ведущая организация: ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

Защита диссертации состоится _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 21.2.068.03 при ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107) и на сайте: <http://ssmu.ru>

Автореферат разослан _____ 20__ года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Мустафина Лилия Рамильевна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Изучение последствий тяжелой черепно-мозговой травмы (ТЧМТ) является актуальной задачей современной медицины [Dixon K. et al., 2017, Pavlovic D., 2019]. Согласно статистическим данным более 50 миллионов человек ежегодно страдают от травм различного этиологического и повреждающего фактора [Maas E. et al., 2017]. Высокие показатели смертности и инвалидности, а также молодой возраст пострадавших определяют общий экономический, медицинский и социальный ущерб от черепно-мозговых травм, которые в этом отношении опережает сердечно-сосудистые и опухолевые заболевания [Laskowitz D. et al., 2016, Иванова Н.Е., 2020]. Ранее считалось, что основной ущерб наносится в момент травмы, однако сейчас стало очевидно, что последствия могут проявиться через несколько лет после происшествия [Hadanny A. et al., 2016, Ahmadpour S. et al., 2019, Pavlovic D., 2019].

Реорганизация нейроглиального комплекса головного мозга представляет актуальное направление исследований, при этом специфичность реакции мозга на травму зависит от множества факторов, включая характер и тяжесть травмы, общее состояние организма и его индивидуальные особенности, возможное наличие предыдущих повреждений мозга и степени токсичности деструктивных клеток головного мозга, проявляющейся через признаки апоптоза и оксидативного стресса [Cole J. et al., 2018]. В данной ситуации патоморфологические изменения, связанные с посттравматическим некрозом, охватывают весь мозг, нарушая его структурно-функциональную организацию на последовательных этапах повреждения [Salmond C. et al., 2005, Van den Bedem H. et al., 2017, Cole J. et al., 2018, Harris T. et al., 2019].

Для посттравматического периода также характерна усиленная активация астроцитов, олигодендроглиоцитов и микроглиоцитов, представляющих собой интегрированную систему очистки головного мозга с выраженной региональной специфичностью [Burda J., 2014., Pavlovic D., 2019]. При этом внимание разных специалистов привлечено использованием биохимических маркеров, включая нейроспецифические белки, из-за их широкого клинического применения, возможности проведения ранней диагностики, контроля эффективности терапии и прогнозирования результата лечения с учетом степени деструктивных процессов в нервной ткани [Murray H., 2022].

Особенно важно исследование влияния закрытого повреждения на сенсомоторную кору, как основной очаг травматизации, и на гиппокамп, как область без прямого контакта с травмирующим объектом, повреждение которого оказывает влияние на когнитивные функции, ориентацию в пространстве и консолидацию памяти [Salmond C. et al., 2005, Spitz G. et al., 2013]. В ответ на травматизацию тяжелой степени и вторичные нарушения микроциркуляторной сети, цитоскелет нейронов и синапсов претерпевает неоднократные модификации, что приводит к нарушению процесса передачи импульса и торможению физиологической реорганизации межклеточных

связей в различных отделах головного мозга [Яшкичев В.И., 2015, Stein T. et al., 2015]. Исследования в этой области позволяют понять механизмы, лежащие в основе пластичности нейронных сетей и позволяющие нейронам адаптироваться к новым условиям путем их качественного и количественного ремоделирования [Jacquens A., 2022].

Несмотря на интенсификацию исследований актуальность данной патологии не снижается, поскольку изучение реакции компонентного состава нервной ткани на травматическое повреждение является неотъемлемой частью для поиска новых направлений в механизмах дегенерации и компенсации высших отделов мозга в посттравматическом периоде, поэтому предметом исследования было изучение цитоархитектоники неокортекса и гиппокампа после тяжелого травматического повреждения с помощью световых, иммуногистохимических и морфометрических способов изучения структурных компонентов нервной ткани (нейроны, нейроглия, микрососудистая сеть и синапсы).

Цель исследования выявление структурной реорганизации нейро-глио-сосудистого комплекса сенсомоторной коры и гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы.

Задачи исследования:

1. Изучить цито- и синаптоархитектонику сенсомоторной коры и гиппокампа нейронов, особенности изменения глиальных клеток и синапсов крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после черепно-мозговой травмы, используя классические и иммуногистохимические методы исследования.

2. Оценить нейроглиальное взаимоотношение сенсомоторной коры и гиппокампа крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после моделирования тяжелой черепно-мозговой травмы.

3. Дать количественную оценку пространственной реорганизации астроцитов сенсомоторной коры крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после моделирования тяжелой черепно-мозговой травмы с помощью фрактального анализа.

4. Провести сравнительную характеристику структурно-функциональным изменениям микроциркуляторной сети сенсомоторной коры крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы.

Научная новизна. В настоящем исследовании впервые был разработан и апробирован способ моделирования черепно-мозговой травмы у крыс с использованием установки с ударным механизмом, позволяющий создать условия для воспроизведения клинической картины травматизации мозга различной степени тяжести без выявления в серии экспериментов сателлитных поражений с максимально схожими характеристиками повреждения головного мозга.

Получены новые данные о динамике структурной реорганизации СМК и гиппокампа белых крыс после ТЧМТ. Установлен гетерохронный и гетероморфный характер реорганизации нейроглиальных взаимоотношений

СМК в слоях III и V, а также зон СА₁, СА₃ гиппокампа мозга крыс в течение 30 сут после моделирования ТЧМТ.

Впервые проведена количественная оценка пространственной реорганизации астроцитов в сенсомоторной коре крыс с помощью фрактального анализа в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 дней после моделирования тяжелой черепно-мозговой травмы.

Произведена оценка структурных изменений сосудов микроциркуляторного русла СМК крыс после травматического повреждения тяжелой степени.

Установлены корреляционные связи между нейроглиальным индексом и площадью сосудистой сети СМК мозга крыс после ТЧМТ.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы дополняют информацию о морфологии головного мозга экспериментальных животных в норме и после ТЧМТ. Количественные данные позволили оценить особенности взаимоотношений нейронов и глиоцитов в межнейронной коммуникации двух отделов головного мозга в ответ на тяжелое травматическое повреждение. Результаты диссертационного исследования будут полезны в области клеточной биологии, гистологии, цитологии, нейрохирургии и неврологии и могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах гистологии, цитологии и эмбриологии при изучении разделов «нервная ткань, сосудистая и нервная система».

Методология и методы диссертационного исследования. Исследование основано на сравнительном анализе структурной организации сенсомоторной коры и гиппокампа на различных уровнях детализации до и после получения тяжелой черепно-мозговой травмы. В ходе работы были использованы классические и современные гистологические методы: окраска гематоксилин-эозином и тионином по методу Ниссля, наливка микрососудистой сети черной гистологической тушью, иммуногистохимия с применением различных индикаторов компонентов нервной ткани, морфометрия и статистическая обработка полученных данных эксперимента.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов объясняется достаточным объемом групп животных и корректным формированием изучаемых выборок, обработанных с использованием современных гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования. Сформулированные выводы хорошо обоснованы и логически вытекают из результатов исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В острый период (1–7 сут) после тяжелого травматического повреждения головного мозга в двух изученных отделах (сенсомоторная кора и гиппокамп) преобладают деструктивные изменения нейро-глио-сосудистого комплекса: увеличивается количество гипер- и гипохромных нейронов, а также микроглиоцитов, клеток-теней, нейронов с признаками отека-набухания и деструкцией цитоскелета перикариона, отмечается редукция и набухание дендритного дерева астроцитарных клеток, полиморфность синаптических

терминалей, происходит неоднородное изменение плотности микрососудистой сети мозга. Данные структурные изменения неокортекса (1–3 сут) и гиппокампа (3–7 сут) носят различный характер по степени тяжести поражения и отличаются во временном интервале.

2. В *промежуточный период* (14–30 сут) после тяжелой черепно-мозговой травмы репаративные изменения в сенсомоторной коре и гиппокампе мозга носят приблизительно равномерный характер. Уменьшается соотношение гипер- и гипохромных нейронов в пользу нормохромных нейронов, снижаются признаки отека-набухания, частично восстанавливается опорно-двигательная структурированность нейронов, усложняется пространственная реорганизация астроцитов, увеличивая площадь синаптических терминалей и нормализуя численную плотность клеток микроглии.

Внедрение и апробация работы. Основные положения работы доложены на научно-практических конференциях международного и всероссийского уровня (Курск, 2020; Тверь 2022; Ленинск-Кузнецкий, 2023; Москва, 2023). Результаты работы были зарегистрированы в виде патента (Патент РФ 2788904С1, 25.10.2021), 2 баз данных (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022621556, 01.07.2022 и свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022621746, 15.07.2022) и интегрированы в учебный процесс для образовательной программы «Гистология, эмбриология, цитология» кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России и одобрены на межкафедральном заседании сотрудников кафедр гистологии, цитологии и эмбриологии, анатомии человека, топографической анатомии и оперативной хирургии, биологии и судебной медицины, правоведения ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России (Омск, 2024).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых центральных научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и доктора биологических наук по специальности 1.5.22. «Клеточная биология». При этом автором получены: 1 патент на изобретение, отражающий внедрение результатов исследования в практику и подтверждающий их инновационность и регистрация 2 баз данных, позволяющих обеспечивать сохранность и доступность научной информации, что способствует развитию исследовательской деятельности в данной области.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, главы собственных данных, обсуждения результатов, выводов, списка сокращений, списка литературы. Список литературы содержит 229 источников, в том числе 53 отечественных и 176 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована с помощью 2 схем, 11 таблиц и 48 рисунков.

Личный вклад автора. Эксперимент, забор материала, приготовление гистологических образцов головного мозга крыс, микрофотографирование, морфометрический анализ изображений и статистическая обработка полученных данных, оформление диссертации и автореферата выполнены исследователем самостоятельно.

II. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект и предмет исследования. Исследование выполнено на базах ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава РФ и учебно-научного центра эндоскопической хирургии Wetlab ИВМиБ ОмГАУ им. П. А. Столыпина. В качестве экспериментальных животных использовали белых крыс сток Wistar ($n = 63$, самцы) массой 350–400 г. и возрастом 15–20 недель. Исследования проводили на основании директивы Европейского Парламента №2010/63/E от 22.09.2010 и с учетом рекомендаций Международного комитета по работе с лабораторными животными. Моцион содержания, принципы кормления крыс и выбранный способ моделирования были заслушаны и одобрены членами локального этического комитета (протокол № 10 от 19.09.2023).

Дизайн исследования представлен на Рисунке 1.



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Экспериментальная модель. Тяжелая степень повреждения головного мозга была смоделирована путем дозированного механического воздействия падающего груза на затылочно-теменную область коры полушарий для формирования контузионного очага повреждения. Для этого способа моделирования была применена установка с ударным механизмом, характеризующаяся применением устройства представленное на рисунке 2, основанного на принципе передачи кинетической энергии цилиндрического падающего груза (массой 598 г. с высоты 35 см) [Патент № 2788904 от 25.10.2021]. Подопытных животных наркотизировали при помощи внутримышечного введения раствора Zoletil 100 в дозировке 10 мг/кг с обязательной предварительной премедикацией раствором сульфата атропина в дозировке 0,1 мг/кг.

Состояние экспериментальных животных в посттравматическом периоде оценивалось в баллах [Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Тель Л.З., 1982]. Степень выраженности психоневрологического статуса оценивали с помощью психометрической шкалы McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной и неврологических тестов: открытое поле, установки позы, тест с вытягиванием лапы.

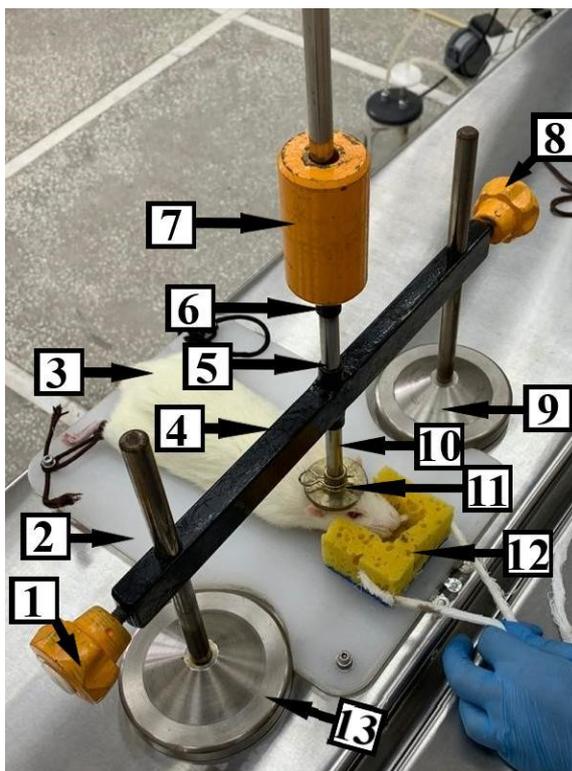


Рисунок 2 – Устройство для моделирования ЧМТ: 1 – правый торцевой винт; 2 – операционный стол; 3 – наркотизированное животное; 4 – планка; 5 – центральная втулка; 6 – ударная втулка; 7 – груз; 8 – левый торцевой винт; 9 – левая опора; 10 – направляющая штанга; 11 – ударная площадка; 12 – подушка из губчатого материала; 13 – правая опора

Гистологические методы. Вывод животных из эксперимента проводили через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ТЧМТ под наркозом. Сосудистое русло мозга промывали введением 100–125 мл раствора 0,9 % NaCl и Фрагмина (5 000 единиц) в левый желудочек сердца, мозг фиксировали перфузией 30 мл 4 % раствора параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) через аорту под давлением 90–100 мм рт. ст. в течение 15 мин. Материал хранился в холодильнике при температуре +4°C. Головной мозг экспериментальных животных заключали в парафин. Серийные фронтальные срезы изготавливали при помощи микротомы HM450 на уровнях 1.2 – (–3.0) и 2,2 – (–4,8) от Брегмы толщиной 2–4 мкм [Paxinos G. et al., 2005]. Полученные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и тионином по методу Ниссля на автоматическом стейнере Sacura. С каждого среза фотографировали по 10–15 полей зрения одного отдела. При морфометрическом анализе брали 200 (на срок) случайно выбранных полей зрения.

Общая морфология и количественный анализ организации неокортекса и гиппокампа проводили с использованием серийных цифровых микрофотографий образцов, окрашенных гематоксилин-эозином и тионином по методу Ниссля, полученных на микроскопе Leica DM 1000 с высоким разрешением (tiff, 2 592 × 1 944 пикселей) на увеличении ×4, ×10, ×40, ×100 и обработанных в Photoshop CC с использованием фильтра Camera RAW и увеличением размерности изображений до 3 780 × 2 835 пикселей/см, а разрешением 600 пикселей/дюйм.

Наливка микрососудистого русла головного мозга тушью. Для оценки степени наполнения и подсчета численной плотности сосудистой сети использовали способ наливки кровеносных сосудов головного мозга горячей застывающей массой 10 % желатина с черной гистологической тушью HISTOSAFE® [J.L. Corbin, 1961]. Оценку общей плотности проходимости сосудов осуществляли при помощи программы Image 1.53. Область интереса соответствовала 25–30 случайно отобраным полям зрения СМК головного мозга крыс с двух сторон.

Иммуногистохимические методы. Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах, помещенных на маркированные предметные стекла Snowcoat X-TRA, цветное поле для маркировки – Snowcoat X-TRA M/Slides. Использовали первичные антитела к IBA1, GFAP, NSE, р38. В процессе приготовления препаратов использовали: отмывочный раствор Бонд, буфер для демаскировки рН9, раствор для разведения антител.

Морфометрический анализ. Морфометрический анализ проведен с использованием программы ImageJ 1.53 [Мыщик А. В. и др., 2012; Ferreira T. A., Rasband W., 2010]. Согласно литературным данным, в нейроморфологии достаточным количеством экспериментальных животных на срок для получения достоверных результатов являлось 6–8 животных в группе, 5–6 серийных срезов и 5–10 случайных полей зрения объекта (отдела головного

мозга) на каждом срезе [Bolon B. et al., 2005; Ooigawa H. et al., 2006]. В настоящем исследовании мы сравнивали по 25 рандомизированных полей зрения на срок.

Фрактальный анализ. Фрактальный анализ использовали для оценки астроцитарных сетей СМК с помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods) по разработанным ранее подходам [Karperien A., 2013]. В настоящем исследовании измерения закономерно показали более высокие значения фрактальной размерности и позволили оценить лакунарность астроцитарной сети СМК.

Статистический анализ. Биометрический анализ осуществлялся с использованием программы Statistica 10.0 и возможностей программы Microsoft Excel. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принимался равным 0,05. Проверка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Shapiro-Wilk (Statistica 10.0), статистических гипотез – с помощью непараметрических методов статистики. При получении статистически значимого результата проводили парное сравнение с помощью Mann–Whitney U-test, ANOVA Kraskel–Wallis для независимых выборок и Wilcoxon test для зависимых выборок. Материал представлен в процентах (95 % доверительный интервал – 95 % ДИ), как медиана (Q_2), нижний (Q_1) и верхний (Q_3) квартили.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.2.1. Сравнительное гистологическое исследование

После ТЧМТ все структурные компоненты СМК и гиппокампа – микрососуды, нейроны и нейропилль, глиальные клетки – подвергались реактивным и деструктивным изменениям (Рисунок 3). Для нервных клеток и нейропиля были характерны – де- и гипергидратационные изменения перикариона и их отростков, со смещением или эктопией деформированного набухшего ядра, вакуолизацией цитоплазмы и нейропиля, кариорексисом и кариолизисом. С позиции классической патоморфологии, данные изменения могут интерпретироваться, как результат комплексного воздействия травмы на нервную ткань.

В начале острого периода ТЧМТ (1 сут) на препаратах в слоях III и V СМК, отмечались в поле зрения нормохромные нейроны с эктопией ядрышка и просветлением цитоплазмы, клетки-тени, а в слое V СМК начинали появляться признаки гидропической дистрофии нейронов с перинуклеарным и перичеселлярным отеком. На 3–7 сут в обоих слоях СМК регистрировалось набухание тел нейронов и их отростков, отмечались гипо- и гиперхромные нейроны с сохраненным ядрышком и эктопией, гомогенизированные необратимые пикноморфные нейроны, а также отмечались признаки периваскулярного отека нейропиля.

В гиппокампе в зоне CA₁ и CA₃ через 1–3 сут появлялись нейроны с признаками изменения тинкториальных свойств без сморщивания,

отмечались очаги выпадения нейронов с выраженным отеком нейропилем и пикноморфные нейроны с выраженным коагуляционно-ишемическим некрозом. Впоследствии в зоне СА₃ гиппокампа появление многообразия форм пикноморфных нейронов и гиперхромных нейронов без сморщивания с эктопией ядрышка и гомогенизацией цитоплазмы, отмечалось лишь на 7 сут после ТЧМТ на фоне общей отека нейропиля. Выявленные структурные изменения нейронов носили очаговый характер и отмечались наиболее выражено в слое III СМК уже на 1 сут после ТЧМТ, в отличие от гиппокампа, в котором подобные изменения были выявлены лишь на 7 сут, а именно в зоне СА₃.

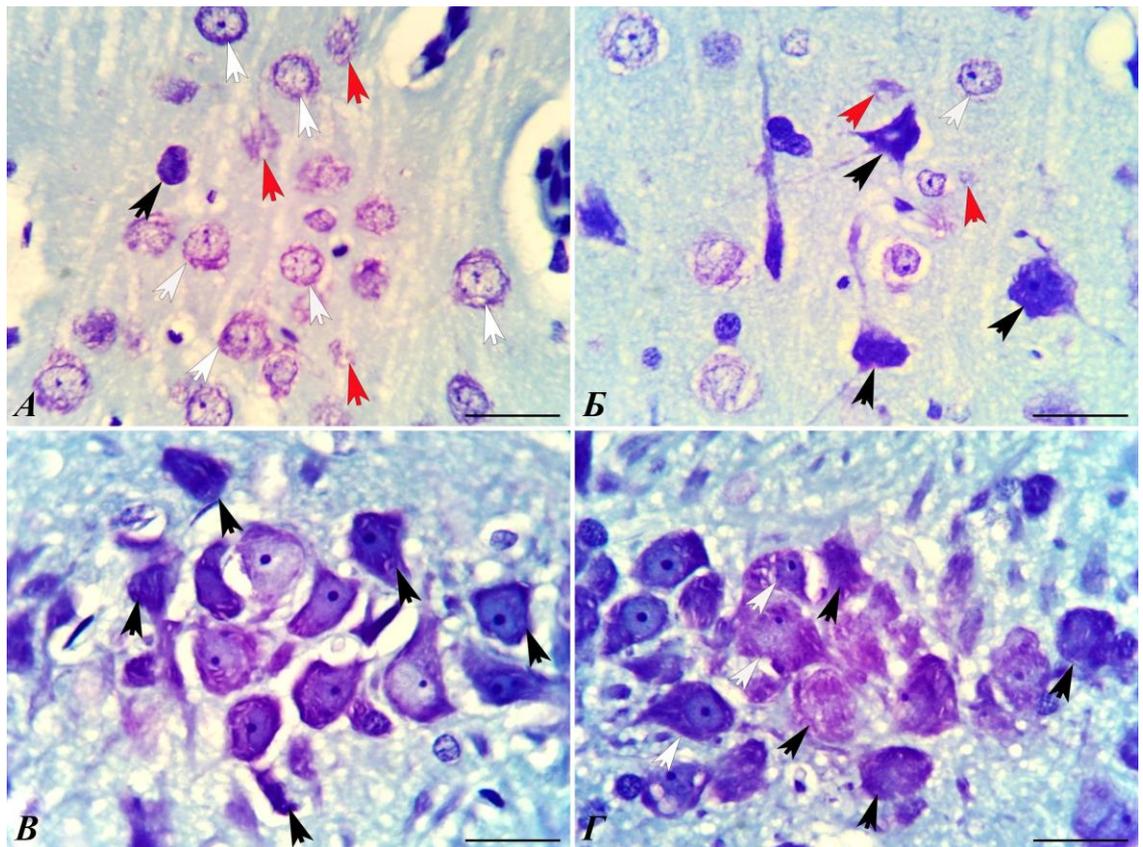


Рисунок 3 – Фрагменты слоя III (А) и V (Б) СМК, полей СА₁ (В) и СА₃ (Г) гиппокампа через 3 сут после ТЧМТ: красные стрелки – клетки-тени, черные стрелки и белые стрелки – темные нейроны и гиперхромные нейроны на различных стадиях дегенерации. Окраска по Нисслю. Объектив: $\times 100$, шкала – 20 мкм

В промежуточном периоде на 14 сут в СМК отмечались характерные признаки тяжелой гидропической дистрофии с перинуклеарным и перичеселлярным отеком и большое содержание необратимых поврежденных нейронов с очагами выпадения нейронов в результате фагоцитоза их микроглиоцитами. На 30 сут сохранялись признаки гипо-, гиперхромных сморщенных нейронов с крупноячеистой вакуолизацией цитоплазмы, отеком нейропилем и обильным содержанием микроглиоцитов. В зонах

CA₁ и CA₃ гиппокампа на 14–30 сут отчетливо прослеживались необратимые изменения нервной ткани: пикноморфные нейроны, отек нейропиля, гиперхромия тел нейронов, эктопия ядрышек вплоть до их потери. При этом общая плотность распределения пирамидальных нейронов в слоях III и V СМК, зон CA₁ и CA₃ гиппокампа была снижена на 31,5, 17,8, 41,2 и 42,8 %, что в целом и достоверно отличалось друг от друга (Рисунок 4).

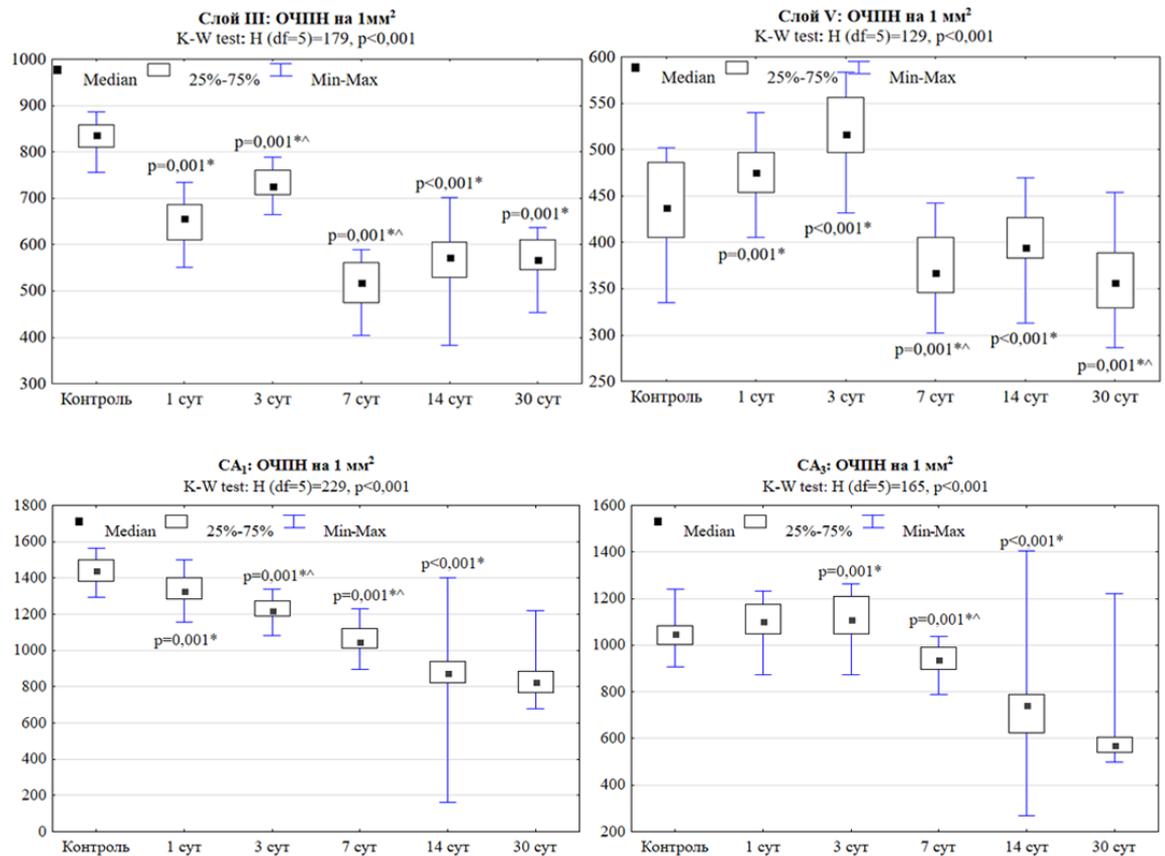


Рисунок 4 – Общая численная плотность нейронов слоев III и V СМК и CA₁ и CA₃ гиппокампа в контроле, через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ТЧМТ: * – сравнение с контролем, ^ – с предыдущим сроком (Mann–Whitney U-test, p < 0,05). Материал предоставлен, как медиана (*Median – Q₂*), 25–75% квантили (*Q₁–Q₃*) и диапазон без выбросов (*Min-Max*). Множественное сравнение между всеми подгруппами основной группы проводили с помощью ANOVA Kraskel–Wallis

Реорганизация нейроглиальных отношений приводила к изменению показателя нейроглиального индекса (НГИ) (Рисунок 5). В слое III, через 1 сут после ТЧМТ, показатель НГИ увеличился в 1,3 раза. Выраженный скачок нейроглиального индекса отмечен в обоих слоях СМК через 7 сут, что характеризовалось его повышением в сравнении с предыдущим сроком в 1,5 раза в слое III СМК, а в слое V – в 1,1 раза. При этом на 14–30 сут, в СМК прослеживалось относительное снижение НГИ, однако уменьшение численной плотности олигодендроцитов и астроцитов отмечалось через 30

сут после ТЧМТ, но максимальное уменьшение олигодендроцитов отмечалось в слое V СМК и составило 43,89 %. В зонах СА₁ и СА₃ гиппокампа, наоборот на протяжении всего посттравматического периода происходило относительное повышение НГИ, при чем с максимальным пиком на 14 сут (в 1,3 раза в поле СА₁, и в 1,2 раза – СА₃ относительно уровня предыдущего срока).

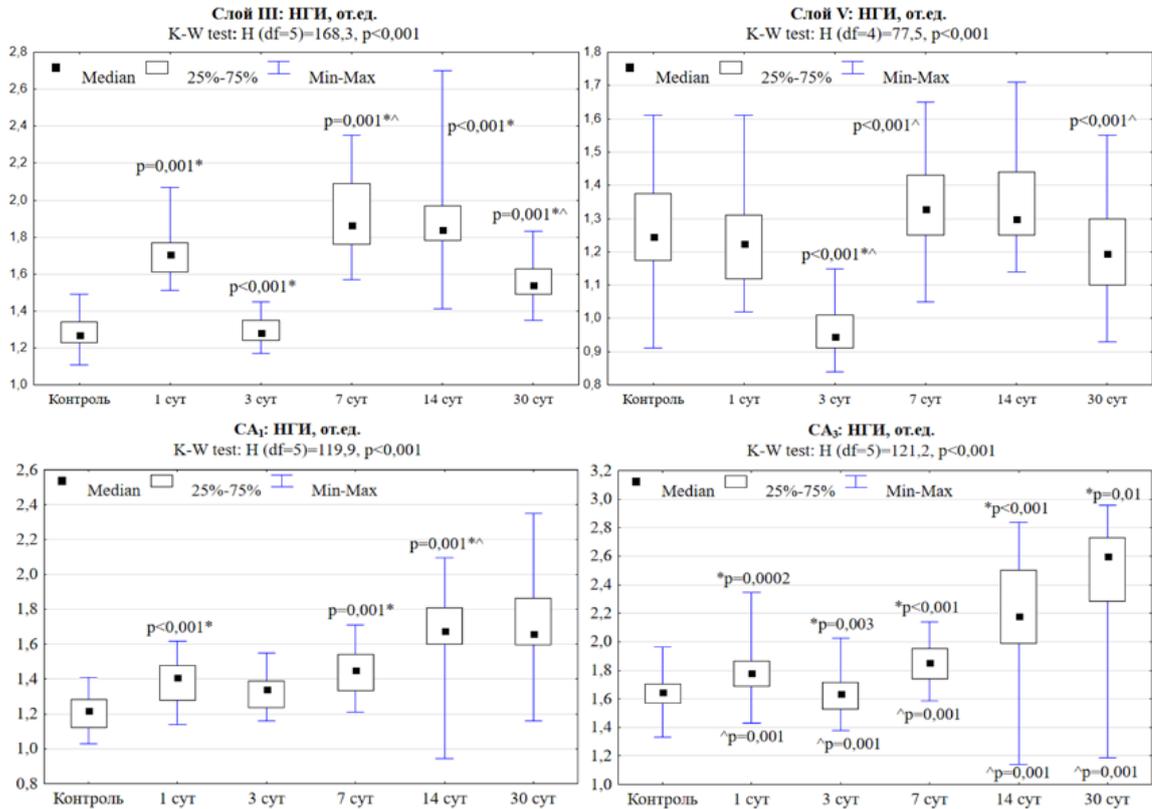


Рисунок 5 – Нейроглиальный индекс слоев III и V СМК и СА₁ и СА₃ гиппокампа в контроле, через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ТЧМТ: * – сравнение с контролем, ^ – с предыдущим сроком (Mann–Whitney U-test, p <0,05). Материал предоставлен, как медиана (*Median – Q₂*), 25–75% квантили (*Q₁–Q₃*) и диапазон без выбросов (*Min-Max*). Множественное сравнение между всеми подгруппами основной группы проводили с помощью ANOVA Kraskel–Wallis

При морфометрическом анализе микрососудистого русла СМК (способ наливки сосудов черной тушью с желатином) выявлена асимметрия изменений ответа между правым и левым полушарием относительно площади сосудов в слое III СМК на 3 сут (Wilcoxon test, p=0,02), а в слое V СМК уже на 1 сут (Wilcoxon test, p=0,016). При этом в слое III СМК через 3 сут после ТЧМТ выявлена слабая положительная корреляционная связь (Spearman's rank correlation test: r=0,47; p=0,01) между общей численной плотностью срезов сосудов и их относительной площадью. Для слоя V СМК была выявлена иная закономерность: общая численная плотность срезов

микрососудов значительно не изменялась ни через 1 сут, ни через 3 сут после ТЧМТ. Заметные деструктивные изменения нейронов слоя III СМК были связаны с уменьшением общей плотности проходимых микрососудов, препятствуя распространению кровотока в микрососудистой сети, при этом в слое V СМК этого проследить не удалось, там преобладали дилатационные изменения, что свидетельствовало о проявлении признаков дисфункции эндотелия и различиях в реакции различных уровней СМК.

2.2.2 Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование образцов мозга крыс после ТЧМТ показало неравномерное распределение NSE-позитивного материала в перикарионах нейронов и нейропиле головного мозга крыс, как в разные периоды исследования, так и в соседних областях. Максимальное содержание NSE-позитивных нейронов в слое III СМК (относительно общей численной плотности нейронов (ОЧПН) на 1 мм^2) отмечалось через 1 и 3 сут после повреждения – 35 и 42 %. На 7 сут этот показатель постепенно уменьшался на 3 % от предыдущего срока, тогда как на 14 сут происходило дальнейшее снижение доли позитивных нейронов до 31 %. Даже на 30 сут после ТЧМТ доля типированных нейронов к NSE в СМК оставалась статистически значимо выше, чем в контроле – 21 %. В слое V СМК статистически значимое увеличение доли NSE-позитивных нейронов отмечалось уже на 3 сут после ТЧМТ и составляло 46 %. В отличие от слоя III СМК относительное содержание этого маркера в слое V СМК на 1 сут превышало полученные данные на 6 % соответственно. В дальнейшем происходило резкое снижение доли нейронов на 7 и 14 сут после ТЧМТ (35 и 31% соответственно), но восстановление показателя до уровня контрольных значений не происходило даже на 30 сут после травматизации. Неоднородная степень экспрессии NSE-позитивного материала прослеживалась и в областях исследования гиппокампа (CA_1 и CA_3). Относительно повышенное содержание NSE-позитивных нейронов в CA_1 (относительно ОЧПН на 1 мм^2) отмечалось только через 14 сут после ТЧМТ и составило 25 %, тогда как в поле CA_3 это происходило уже на 1 сут – 23 %. По сравнению с 1 сут через 3 и 7 сут после ТЧМТ в гиппокампе происходило уменьшение доли NSE-типированных нейронов в обеих областях, но и через 30 сут после ТЧМТ содержание меченых нейронов превышало уровень контрольных значений на 18–20 %. Динамика изменений содержания NSE-позитивных нейронов после ЧМТ отражала, с одной стороны, необратимость разрушения ткани головного мозга, а с другой – наличие резервов для долгосрочной адаптации к потере части нейронов.

Парный корреляционный анализ (Spearman's rank correlation test) показал, что между содержанием NSE-позитивных и гиперхромных несморщенных нейронов (ГНН) после ТЧМТ в головном мозге белых крыс существовала сильная положительная связь ($R=0,87$; $p=0,0001$), а между NSE-позитивными и гиперхромными сморщенными нейронами (ГСН) –

положительная связь средней силы ($R=0,61$; $p=0,0001$). Мы полагаем, что это связано с разной долей необратимо поврежденных нейронов и низкой метаболической активностью среди ГНН и ГСН. То есть, ГНН имели больший адаптационный потенциал за счет активации NSE. Это, вероятно, свидетельствовало о том, что все метаболические резервы реактивно измененных клеток были мобилизованы для компенсаторно-репаративной реорганизации нейронной сети в неокортексе и гиппокампе после ЧМТ.

После ТЧМТ в СМК и гиппокампе отмечалась реорганизация глиальных клеток, что имело отражение при исследовании гистологических срезов, окрашенных иммуногистохимическими реактивами. По данным иммуногистохимического типирования IBA1, в слоях III и V СМК и полях CA₁ и CA₃ гиппокампа происходило изменение формы микроглиоцитов до округлой или овальной и пространственная реорганизация отростков. Однако, на протяжении всего изучаемого срока исследования восстановление показателя до уровня контрольных значений в изучаемых областях СМК и гиппокампа не происходило, что подтверждает высокую степень активации этих клеток в связи с их фагоцитарной функцией в ответ на травматическое повреждение, при чем высокая степень активации в СМК прослеживалась с 1–7 сут, а в гиппокампе наиболее активно увеличивалась на 14–30 сут после ТЧМТ.

Для изучения пространственной реорганизации отростков астроцитов после ТЧМТ использован метод фрактального анализа их бинарных изображений. При этом способе рассчитывались фрактальная размерность – показатель заполнения нервной ткани (фрактального пространства) астроцитами (фрактальные структуры) и лакунарность – показатель неоднородности распределения фрактальных структур (Рисунок 6).

При этом наиболее сильно изменялась фрактальная размерность в слое III СМК. В течение 14 сут показатель был меньше контрольного значения, а в слое V СМК к этому времени он уже восстанавливался. Для слоя III СМК была характерна и самая высокая лакунарность после ТЧМТ. В совокупности все это свидетельствовало о более высокой реактивной реорганизации отростков астроцитов мелкоклеточного слоя III СМК.

Морфометрический анализ верифицированных синапсов с помощью иммуногистохимической реакции на синаптофизин показал, что численная плотность синаптических терминалей через 1 сут после ТЧМТ в разных слоях СМК уменьшалась в 1,5–2 раза. В большей степени страдали синапсы слоев III и V СМК. Данный показатель межнейронных взаимоотношений оставался на уровне ниже контрольного в течение всего периода наблюдения. ТЧМТ приводила к появлению право-левосторонней асимметрии морфофункциональных изменений синапсов полушарий СМК. Об этом свидетельствовали выявленные нами значимые различия общей численной плотности синаптических терминалей (ОЧПТ) через 1 сут и через 14 сут после травмы. Изменения подобного рода можно объяснить неравномерностью механического воздействия свободно падающего груза.

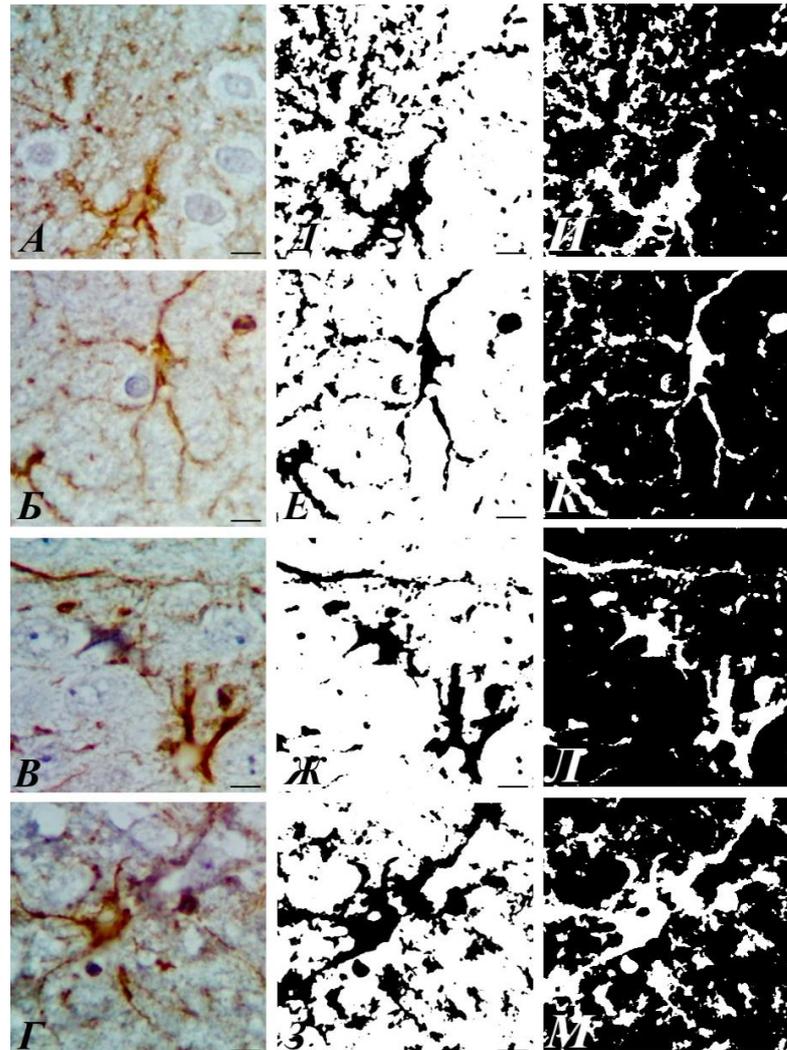


Рисунок 6 – Астроциты слоя III СМК через 1 сут (А, Д, И) и V СМК (Б, Е, К) через 3 сут и гиппокампа зоны СА₁ (В, Ж, Л) через 1 сут и зоны СА₃ (Г, З, М) через 3 сут после ТЧМТ: А, Б, В, Г – оригинальные изображения, Д, Е, Ж, З – маски изображения оценивания показателя фрактальной размерности, И, К, Л, М – маски изображения оценивания показателя фрактальной лакуарности. Иммуногистохимическая реакция на GFAP, объектив: $\times 100$, шкала – 20 мкм

В нейропиле молекулярного слоя СА₁ и СА₃ гиппокампа через 1 сут после ТЧМТ ОЧПТ уменьшилась на 30–40 % (Kruskal-Wallis test, $p=0,01$). Через 7 сут после ТЧМТ в СА₁ отмечена тенденция увеличения этого показателя, что не характерно для поля СА₃. Вероятно, это было связано с тем, что через 3 и 7 сут относительный показатель снижения ОЧПТ в СА₃ был соответственно на 10 и 20 % больше, чем в СА₁. Несмотря на выявленные различия, общие закономерности реорганизации межнейронных отношений в гиппокампе после ТЧМТ базируются на элиминации излишних или поврежденных (гомеостатическая пластичность) синапсов и образовании новых синапсов (пластичностью Геббеса), что свидетельствует о компенсаторно-восстановительной реорганизации нейронных сетей

гиппокампа путем его структурно-функциональной недостаточности. Вероятно, в *stratum lacunosum* быстро формировались нестабильные новые синапсы, которые и быстро разрушались. Мы полагаем, что при этом какую-то роль играли разнообразные каспазы – протеолитические ферменты, относящихся к семейству цистеиновых протеаз, которые активируются при ишемии и других патологических состояниях, инициируя апоптоз и протеолиз компонентов цитоскелета.

Полученные нами изменения нейро-глио-сосудистого комплекса в остром и промежуточном периоде двух изученных отделов головного мозга свидетельствовали о проявлении продолжительной реорганизации сохранившихся нейронов, синаптических терминалей, глиоцитов и гемокapилляров микрососудистой сети. Следовательно, результаты исследования будут полезны для понимания комплексного подхода исследования патоморфологических изменений, происходящих в головном мозге при закрытых травматических повреждениях черепа различной степени тяжести.

ВЫВОДЫ

1. Неокортекс слоя III и V сенсомоторной коры и гиппокамп полей CA₁ и CA₃ мозга крыс в контроле и через 1, 3, 7, 14 и 30 сут статистически значимо отличались по нейрoцито-, глиoцито- и синаптоархитектоники, а также по содержанию гипер- и гипохромных нейронов, нейроглиальному отношению, цитоморфологическая характеристика которых свидетельствовала об их прижизненных дегенеративных изменениях.

2. В острый период (1 и 7 сут) после тяжелой черепно-мозговой травмы преобладали деструктивные изменения нейро-глио-сосудистого комплекса головного мозга крыс. Изменения неокортекса (1–3 сут) и гиппокампа (3–7 сут) мозга крыс носили различный характер по степени тяжести поражения и отличались во временном интервале: показатель плотности пирамидных нейронов в поле CA₁ превалировал над полем CA₃, что проявлялось длительным сохранением высокой гидратации гиперхромных сморщенных нейронов на разных стадиях дегенерации и подтверждалось отсутствием активного саногенеза, характерного для поля CA₃ и слоя III сенсомоторной коры.

3. Промежуточный период (14 и 30 сут) после тяжелой черепно-мозговой травмы характеризовался пролиферацией нейроглии, снижением доли гипер- и гипохромных нейронов в пользу нормохромных нейронов, численная плотность микроглиоцитов доходила до уровня контрольных значений показателя, при этом изменения в сенсомоторной коре и гиппокампе мозга крыс носили равномерный характер.

4. Фрактальный анализ после тяжелой черепно-мозговой травмы мозга крыс показал усложнение пространственной реорганизации астроцитов, в частности происходило снижение показателя фрактальной размерности и

увеличение лакунарности в слое III сенсомоторной коры вплоть до 14 сут, в отличие от слоя V, в котором данные показатели восстанавливались до уровня контрольных значений. Это свидетельствовало о более высокой реактивной реорганизации отростков астроцитов именно мелкоклеточного слоя III, в котором и отмечалось максимальное повреждение пирамидных нейронов.

5. Показатель нейроглиального индекса увеличивался и в сенсомоторной коре и гиппокампе на фоне увеличения содержания пикноморфных нейронов после тяжелой черепно-мозговой травмы, доказывая феномен саногенеза нервной ткани путем фагоцитоза микроглией необратимо поврежденных нейронов.

6. Тяжелая черепно-мозговая травма приводила к появлению правосторонней асимметрии морфофункциональных изменений синапсов полушарий сенсомоторной коры. Об этом свидетельствовали различия общей численной плотности синаптических терминалей через 1 сут (в слое I; $p=0,002$) и через 14 сут (в слое III, $p=0,01$; в слое V, $p=0,038$) после травмы.

7. В гиппокампе через 1 сут общая численная плотность терминалей уменьшалась на 30–40% (критерий Манна–Уитни, $p=0,01$), но через 7 сут после тяжелой черепно-мозговой травмы в СА₁ отмечена тенденция увеличения показателя синаптических терминалей (критерий Манна–Уитни, $p=0,01$), что не было характерно для СА₃. В промежуточном периоде (14 и 30 сут) сохранялся дефицит межнейронных синапсов (20–40 %) и отмечалась гидропическая дистрофия, это свидетельствовало о компенсаторно-восстановительной реорганизации нейронных сетей гиппокампа на фоне его структурно-функциональной недостаточности в виде образования новых синапсов, которые и быстро разрушались.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Горбунова А. В. Сравнительная характеристика структурно-функциональных изменений поля СА₃ гиппокампа после острой ишемии и травмы головного мозга белых крыс / А. В. Горбунова, И. П. Кошман, А. Ю. Шоронова, Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Л. М. Макарьева, М. С. Коржук // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2020. – Т.9, №4. – С. 19–30.

2. Кошман И. П. Морфометрическая оценка степени отека-набухания сенсомоторной коры головного мозга белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы / И. П. Кошман, А. Ю. Шоронова, В. А. Акулинин, Д. Б. Авдеев // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященной 80-летию Курского государственного медицинского университета «Достижения современной морфологии - практической медицине и образованию»: сборник научных статей по материалам конференции 21-23 мая 2020г, Курск. – С. 320–328.

3. Степанов С. С. Структурные основы изменения межнейронной коммуникации нейронов поля СА₃ гиппокампа белых крыс после тяжелой

черепно-мозговой травмы / С. С. Степанов, И. П. Кошман, А. Ю. Шоронова, А.Г. Калиничев, В. А. Акулинин, Д. Б. Авдеев, М. В. Маркелова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т.65, №1. – С. 22–34.

4. *Shoronova A. Yu.* Morphological characteristics of neurons and microvascular network of the sensorimotor cortex of rats after severe traumatic brain injury / A. Yu. Shoronova, V. A. Aculinin, L. M. Makarieva, S. S. Stepanov, M. S. Korzhuk, D. B. Avdeev, I. G. Tsuskman // Научно-практическая конференция, приуроченная к 80-летию член-корреспондента РАН, д-ра мед.наук, профессора Д. В. Баженова «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической морфологии» 14 октября 2022г, Тверь. – С. 550–559.

5. *Шоронова А. Ю.* Морфологическая характеристика нейронов сенсомоторной коры и оценка психоневрологического статуса крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы / А. Ю. Шоронова, В. А. Акулинин, М. С. Коржук, С. С. Степанов, Л. М. Макарьева, И. Г. Цускман, А. О. Гирш // Политравма. – 2023. – №1. – С. 72–82.

6. *Шоронова А. Ю.* Морфофункциональные изменения нейронов, глиальных клеток и синапсов в сенсомоторной коре после тяжелой черепно-мозговой травмы / А. Ю. Шоронова, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, М. С. Коржук, Л. М. Макарьева, Д. Б. Авдеев, О. В. Скрыбина, И. Г. Цускман // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2023. – Т.12, № 1. – С. 79–87.

7. *Акулинин В. А.* Морфологические основы реорганизации межнейронных взаимоотношений гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы / В. А. Акулинин, А. Ю. Шоронова, С. С. Степанов, М. С. Коржук, Л. М. Макарьева, Д. Б. Авдеев, Л. В. Степанова // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2023. – Т.12, № 2. – С. 9–21.

8. *Степанов С. С.* Иммуногистохимическая характеристика реорганизации глиальных клеток неокортекса в результате тяжелой черепно-мозговой травмы / С. С. Степанов, А. Ю. Шоронова, В. А. Акулинин, М. С. Коржук, Л. М. Макарьева, Д. Б. Авдеев, Л. В. Степанова, И. Г. Цускман // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2023. – Т.12, № 3. – С. 86–95.

9. *Шоронова А. Ю.* Изменения структурной организации пирамидных нейронов двух отделов головного мозга половозрелых крыс в результате тяжелой черепно-мозговой травмы / А. Ю. Шоронова, С. С. Степанов, В. А. Акулинин, М. С. Коржук, Л. М. Макарьева, И. Г. Цускман, А. О. Гирш // Политравма. – 2023. – Т.12, № 3. – С. 86–95.

10. *Шоронова А. Ю.* Реакция нейроглиальных взаимоотношений сенсомоторной коры и гиппокампа головного мозга крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы / А. Ю. Шоронова, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Л. М. Макарьева // XXIII Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 30-летию центра охраны здоровья шахтеров «Многопрофильная больница: инновационные решения» 19-20 мая 2023г, Ленинск-Кузнецкий. – С. 196–197.

11. *Шоронова А. Ю.* Межклеточные взаимоотношения как материальная основа восстановления функций головного мозга белых крыс после закрытой черепно-мозговой травмы / А. Ю. Шоронова, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Л. М. Макарьева, Д. Б. Авдеев // Юбилейная всероссийская конференция с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» 10-11 ноября 2023г, Москва. – С. 15–16.

12. *Кинзерский А. А.* Патент 2788904 С1 Российская Федерация, МПК (51) G09В 23/28. Способ моделирования черепно-мозговой травмы у крыс с использованием установки с ударным механизмом: № 2021131039: заявл. 25.10.2021: опубл. 25.01.2023 // А. А. Кинзерский, А. Ю. Шоронова, М. С. Коржук, В. А. Акулинин, Л. М. Макарьева; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. – 9 с.

13. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022621556** Российская Федерация. Морфометрические изменения нейронного состава III и V слоя сенсомоторной коры мозга крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы: № 2022621169: заявл. 27.05.2022: опубл. 1.07.2022 / А. Ю. Шоронова, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Л. М. Макарьева, М. С. Коржук, Д. Б. Авдеев; правообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России // Бюллетень «Программы ЭВМ, базы данных и топологии интегративных микросхем». – 2022. – №7–1 с.

14. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022621746** Российская Федерация. Реакция глиоцитов III и V слоя СМК на тяжелую черепно-мозговую травму у белых крыс линии Wistar: № 2022621635: заявл. 04.07.2022: опубл. 15.07.2022 / М. С. Коржук, А. Ю. Шоронова, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Л. М. Макарьева, Д. Б. Авдеев, Л. В. Степанова; правообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России // Бюллетень «Программы ЭВМ, базы данных и топологии интегративных микросхем». – 2022. – №7–1 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ТЧМТ – черепно-мозговая травма

СА₁, СА₃ – поля (зоны) гиппокампа

ЦНС – центральная нервная система

ГНН – гиперхромные несморщенные нейроны

ГСН – гиперхромные сморщенные нейроны

ОЧПТ – общая численная плотность терминалей

NSE – нейрон специфическая енолаза

GFAP – кислый фибриллярный белок астроцитов

p38 – синаптофизин

ROI - зона интереса, только нейропилль

НГИ – нейроглиальный индекс

ЧП – численная плотность