

ГИСТОГЕНЕЗ, РЕАКТИВНОСТЬ И РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ

УДК 616.831.31. 616-005.4. 004.032.26

¹Акулинин В. А., ¹Шоронова А. Ю., ¹Макарьева Л. М., ²Коржук М. С.,
¹Степанов С. С.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ И ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ В СРАВНИТЕЛЬНОМ АСПЕКТЕ

¹Омский государственный медицинский университет Минздрава России,
Омск, Российская Федерация

²Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург,
Российская Федерация

Аннотация. Целью работы является сравнение реакции сенсомоторной коры головного мозга белых крыс на тяжелую черепно-мозговую травму (ЧМТ) и перевязку общих сонных артерий (ПОСА) на протяжении 30 суток после начала эксперимента.

Методика работы заключается в анализе данных гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов оценки структуры нервной ткани в контроле и после экспериментального воздействия.

Контингент испытуемых: экспериментальная группа белых крыс Wistar через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после ЧМТ (n = 30), ПОСА (n = 30) и контроль (интактные животные, n = 6).

Основные результаты работы показали, что после ЧМТ и ПОСА были выявлены деструктивные, компенсаторно-восстановительные изменения нейронов, глиальных клеток и структур межнейронной коммуникации. В совокупности все эти изменения приводили к похожему ответу нервной ткани на воздействие. В большей степени страдала популяция пирамидных нейронов слоя III. Особенностью данных моделей было то, что все реорганизационные изменения происходили на фоне длительного проявления де- и гипергидратационных процессов, реактивного глиоцитоза, гипертрофии отростков глиальных клеток и перестройки межнейронных взаимоотношений за счет деструкции и последующего восстановления синапсов. Можно говорить о стандартном ответном комплексе изменений сначала по типу острой, а затем — длительной хронической ишемии.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, ишемия, сенсомоторная кора, иммуногистохимия, морфометрия.

¹Akulinin V. A., ¹Shoronova A. Yu., ¹Makarieva L. M., ²Korzhuik M. S.,
¹Stepanov S. S.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SENSORIMOTOR CORTEX OF WHITE RATS AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY AND LIGATION OF COMMON CAROTID ARTERIES IN A COMPARATIVE ASPECT

¹Omsk State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Omsk,
Russian Federation

²Military Medical Academy named S. M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the work is to compare the reaction of the sensorimotor cortex of the brain of white rats to severe traumatic brain injury (TBI) and ligation of the common carotid arteries (LCCA) for 30 days after the start of the experiment.

The methodology of the work consists in analyzing the data of histological, immunohistochemical and morphometric methods for assessing the structure of nervous tissue in control and after experimental exposure.

Contingent of subjects experimental group of white Wistar rats 1, 3, 7, 14 and 30 days after TBI (n = 30), LCCA (n = 30) and control (intact animals, n = 6).

The main results of the work showed that destructive, compensatory and restorative changes in neurons, glial cells and structures of interneuronal communication were revealed after PMT and LCCA. Together, all these changes led to a similar response of the nervous tissue to the impact. The population of layer III pyramidal neurons suffered more. The peculiarity of these models was that all reorganization changes occurred against the background of prolonged manifestations of de- and hyperhydration processes, reactive gliocytosis, hypertrophy of glial cell processes and restructuring of interneuronal relationships due to the destruction and subsequent restoration of synapses. We can talk about a standard response complex of changes, first by the type of acute, and then long-term chronic ischemia.

Keywords: traumatic brain injury, ischemia, sensorimotor cortex, immunohistochemistry, morphometry.

ВВЕДЕНИЕ

ЧМТ и нарушение кровотока в магистральных артериях являются основными причинами включения каскадных процессов повреждения элементов нервной ткани головного мозга [1]. При этом тяжелая ЧМТ оказывает влияние на все отделы и структуры головного мозга посредством механизмов первичного и вторичного повреждения нервной ткани в остром, подостром и отдаленном посттравматическом периоде. После ЧМТ и ишемического воздействия в нервной ткани изменяется структура нейронов и глиальных клеток. Совокупность инициированных деструктивных и восстановительных процессов в результате приводит к реорганизации межнейронных и нейроглиальных взаимоотношений [2–6]. Целесообразно изучить и сравнить количественные характеристики подобной реорганизации после тяжелой ЧМТ и перевязки ОСА. В том и другом случае ее качественной характеристикой являются диффузно-очаговые изменения [7, 8]. Исследований подобного рода нет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ с учетом рекомендаций Международного комитета по работе с лабораторными животными, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/E от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей». Используемые способы моделирования ЧМТ и ишемии были согласованы и одобрены комиссией локального этического комитета университета. В ходе эксперимента использовали аутбредных половозрелых белых крыс-самцов ($n = 66$) сток Wistar. Применяли оригинальный авторский способ моделирования травмы с использованием специальной установки с ударным механизмом (Патент № 2788904 от 25.10.2021) [9]. Неполную ишемию головного мозга моделировали путем перевязки общих сонных артерий (без реперфузии) [7]. Эксперимент проводили с предварительной наркотизацией в/м введением Zoletil-100 в дозировке 10 мг/кг. Вывод животных из эксперимента осуществляли через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после его начала также под наркозом. Головной мозг фиксировали перфузией 30 мл раствора 4% формальдегида (фосфатный буфер, pH 7,2–7,4) под давлением 90–100 мм рт. ст. в течение 15 минут. Мозг извлекали, хранили в фиксаторе при температуре 3–5°C и с помощью автомата STP 120 (Thermo FS) помещали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX). Приготовление фронтальных срезов толщиной 2–4 мкм на уровне сенсомоторной коры осуществляли при помощи микротомы HM 450 (Thermo FS) [10]. Микрофотографии (.tiff, 2592 × 1944 пикселей) получали с помощью микроскопа Leica DM 1000.

Качественный и морфометрический анализ структурных элементов нервной ткани СМК проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином и по методу Ниссля, а также с помощью иммуногистохимических реакций. Идентификацию элементов нервной ткани осуществляли при помощи иммуногистохимических реакций на NSE (идентификация нейронов) — нейрон специфическая енолаза (PA5-27452) — кроличьи поликлональные антитела, разведение 1:100 (США), GFAP (идентификация астроцитов и изучение цитоскелета) — глиальный фибриллярный кислый белок астроцитов (MA5-12023) — мышинные (IgG1) моноклональные антитела (клон ASTRO6) (ThermoFisher, США), IBA1 (идентификация микроглиоцитов) — кальций-связывающий белок, специфичный для микроглии (PA5-21274) — кроличьи поликлональные антитела, разведение 1:100 (ThermoFisher, США). Цитоскелет нейронов изучали при иммуногистохимической реакции на MAP2 — белок, ассоциированный с микротрубочками 2 (ab32454) — кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (Abcam, США); синаптические терминалы — синаптофизин (p38) (p38 — синаптофизин (PA0299) — мышинные моноклональные антитела, клон 27G12, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

После взаимодействия с первичными антителами материал инкубировали с вторичными антителами, хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол. Для визуализации использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Таким образом, приготовление препаратов и получение цифровых изображений было стандартным.

В процессе морфометрического анализа определяли общую численную плотность нейронов (ОЧПН, на 1 мм^2), глиальных клеток (ОЧПГК, на 1 мм^2), синаптических терминалей, нейроглиальный индекс, а также относительное содержание гиперхромных сморщенных (пикноморфных) нейронов (ГСМН), гиперхромных несморщенных нейронов (ГНН), гипохромных нейронов (ГиН) и клеток-теней (КТ).

Определение численной плотности синаптических терминалей проводили с помощью инструментов программы ImageJ 1.53 (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process>). Использовали фильтры «Enhance Contrast», «Subtract Background», «Find Maxima» и плагин FindFoci.

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями по следующим направлениям: парное сравнение (между независимыми выборками — Mann-Whitney U-test, между зависимыми выборками — Wilcoxon test), множественное сравнение в динамике (1, 3, 7, 14 и 30 суток) посттравматического периода (ANOVA Kraskel-Wallis), с помощью прикладных программ пакета StatSoft Statistica 10.0. Количественные данные в исследовании представлены как медиана (Me — 50% квартиль, Q2), интерквартильный разброс (Q1-Q3 — 25–75% квартили), (Min-Max), относительные значения (%) пересчитывали из абсолютных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В слоях III и V СМК контрольных животных преобладали нормохромные нейроны. Признаки гидропической дистрофии (вакуолизация ядра и цитоплазмы, отек-набухание), некроза (колликвационного и коагуляционного) и реактивного глиоза отсутствовали.

После двусторонней необратимой ПОСА и ЧМТ в СМК крыс были выявлены реактивные, деструктивные и компенсаторно-восстановительные изменения нейронов, глиальных клеток и структур межнейронной коммуникации. Реорганизация нейроглиальных и межнейронных взаимоотношений происходила на фоне выраженных проявлений гипергидратации нейропиля, дегидратации перикарионов и реактивного глиоза, то есть проявлений отека-набухания. Качественных различий между однотипными изменениями при ПОСА и ЧМТ не установлено. Это были хорошо описанные ранее ишемические преобразования. Множественный анализ (ANOVA Краскела-Уоллеса) показал, что в ходе наблюдения (1–30 суток) все декларируемые показатели изменялись ($p = 0,0001$) после ПОСА и ЧМТ.

Однако результаты парного анализа морфометрических данных свидетельствовали о существовании статистически значимых различий ряда показателей по срокам между ПОСА и ЧМТ. Так, в конце наблюдения, через 30 суток после травмы, в слое III СМК полностью разрушалось 31,5% нейронов, а в слое V — 17,8%. После ПОСА общая численная плотность нейронов в слое уменьшалась на 33,5% ($p > 0,05$), а в слое V — на 23% ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни). Это свидетельствовало о том, что популяция мелких пирамидных нейронов после перевязки артерий страдала в большей степени, чем после ЧМТ. Можно предположить, что перевязка приводила к более выраженному долгосрочному нарушению кровоснабжения сенсомоторной коры (СМК).

О существовании особенностей реакции нейронов и глиальных клеток на ПОСА и ЧМТ свидетельствовали наши данные по сравнению численной плотности гиперхромных нейронов и разных типов глиоцитов (табл. 1–5). В таблицах направлением стрелок показаны различия между ПОСА и ЧМТ по конкретным срокам. При этом показатели ПОСА принимали за 100%.

Таблица 1

**СРАВНЕНИЕ ЧИСЛЕННОЙ ПЛОТНОСТИ ГИПЕРХРОМНЫХ
НЕСМОРЩЕННЫХ НЕЙРОНОВ В СЛОЯХ III И V СМК ПОСЛЕ
ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ
И ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ**

Время после воздействия, сут	Слой III		Слой V	
	ПОСА, %	ЧМТ	ПОСА, %	ЧМТ
1	100	$P > 0,05$	100	$P > 0,05$
3	100	$\uparrow P < 0,05$	100	$\uparrow P < 0,05$
7	100	$\downarrow P < 0,05$	100	$\downarrow P < 0,05$
14	100	$\downarrow P < 0,05$	100	$\uparrow P < 0,05$
30	100	$\downarrow P < 0,05$	100	$\downarrow P < 0,05$

Примечание. Здесь и далее в таблицах различия между переменными статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Таблица 2

**СРАВНЕНИЕ ЧИСЛЕННОЙ ПЛОТНОСТИ ГИПЕРХРОМНЫХ
СМОРЩЕННЫХ НЕЙРОНОВ В СЛОЯХ III И V СМК ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-
МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ И ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ**

Время после воздействия, сут	Слой III		Слой V	
	ПОСА, %	ЧМТ	ПОСА, %	ЧМТ
1	100	$P > 0,05$	100	$P > 0,05$
3	100	$\downarrow P < 0,05$	100	$\downarrow P < 0,05$
7	100	$\downarrow P < 0,05$	100	$\downarrow P < 0,05$
14	100	$P > 0,05$	100	$\downarrow P < 0,05$
30	100	$\downarrow P < 0,05$	100	$\downarrow P < 0,05$

Примечание. Различия между переменными статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Таблица 3

**СРАВНЕНИЕ ЧИСЛЕННОЙ ПЛОТНОСТИ АСТРОЦИТОВ
В СЛОЯХ III И V СМК ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ
И ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ**

Время после воздействия, сут	Слой III		Слой V	
	ПОСА, %	ЧМТ	ПОСА, %	ЧМТ
	100	$\uparrow P < 0,05$	100	$\uparrow P < 0,05$

Окончание табл. 3

Время после воздействия, сут	Слой III		Слой V	
	ПОСА, %	ЧМТ	ПОСА, %	ЧМТ
3	100	$\uparrow P < 0,05$	100	$\uparrow P < 0,05$
7	100	$P > 0,05$	100	$P > 0,05$
14	100	$P > 0,05$	100	$P > 0,05$
30	100	$P > 0,05$	100	$P > 0,05$

Таблица 4

**СРАВНЕНИЕ ЧИСЛЕННОЙ ПЛОТНОСТИ МИКРОГЛИОЦИТОВ
В СЛОЯХ III И V СМК ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ
И ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ**

Время после воздействия, сут	Слой III		Слой V	
	ПОСА, %	ЧМТ	ПОСА, %	ЧМТ
1	100	$P > 0,05$	100	$\uparrow P < 0,05$
3	100	$\downarrow P < 0,05$	100	$\downarrow P < 0,05$
7	100	$\uparrow P < 0,05$	100	$\uparrow P < 0,05$
14	100	$\uparrow P < 0,05$	100	$\uparrow P < 0,05$
30	100	$\uparrow P < 0,05$	100	$\uparrow P < 0,05$

Таблица 5

**СРАВНЕНИЕ ЧИСЛЕННОЙ ПЛОТНОСТИ ОЛИГОДЕНДРОЦИТОВ
В СЛОЯХ III И V СМК ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ
И ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ**

Время после воздействия, сут	Слой III		Слой V	
	ПОСА, %	ЧМТ	ПОСА, %	ЧМТ
1	100	$P > 0,05$	100	$P > 0,05$
3	100	$\uparrow P < 0,05$	100	$P > 0,05$
7	100	$\uparrow P < 0,05$	100	$\downarrow P < 0,05$
14	100	$P > 0,05$	100	$\uparrow P < 0,05$
30	100	$P > 0,05$	100	$P > 0,05$

Мы полагаем, что особенности изменения показателей, характеризующих нейроны, нужно рассматривать в рамках реакции на ПОСА и ЧМТ глиальных клеток. То есть выявили активацию всех глиальных клеток как составляющих единой интегрированной санирующей клеточной системы головного мозга с увеличением значения нейроглиального индекса. Видно, что полная перевязка артерий, вероятно, препятствует реализации потенциальных возможностей этих клеток. Требуется больше времени для устранения последствий деструкции нейронов. То есть вторичные изменения нервной ткани после ЧМТ могут иметь менее фатальные последствия.

Для синаптических терминалей после ПОСА и ЧМТ выявлена волна изменения их численной плотности и относительной площади. При этом максималь-

ная деструкция синапсов в обоих случаях отмечалась через 3 суток после воздействия. В более отдаленном периоде происходило частичное восстановление этих показателей до нижних границ нормы. Степень восстановления была выше после ЧМТ (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, после перевязки общих сонных артерий и тяжелой черепно-мозговой травмы нами выявлены признаки тяжелых ишемических морфологических изменений нервной ткани, сопровождающиеся длительным периодом отека-набухания. При этом, по нашим данным, полная перевязка общих сонных артерий в течение 30 суток после воздействия имела более негативное влияние на реорганизацию сенсомоторной коры головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Qian H-Z., Zhang H., Yin L-L., Zhang J-J. Postischemic housing environment on cerebral metabolism and neuron apoptosis after focal cerebral ischemia in rats. *Curr Med Sci.* 2018; 38(4):656–665. DOI: 10.1007/s11596-018-1927-9
2. Cole J., De Simoni S., Bourke N., et al. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury. *Brain: a journal of neurology.* 2018; 141(3):822–836. DOI: 10.1093/brain/awx354
3. Harris T, De Rooij, Kuhl E. The Shrinking Brain: Cerebral Atrophy Following Traumatic Brain Injury. *Annals of biomedical engineering.* 2019; 47(9):1941–1959. DOI: 10.1007/s10439-018-02148-2
4. Van den B, Kuhl E. Molecular Mechanisms of Chronic Traumatic Encephalopathy. *Current Opinion in Biomedical Engineering.* 2017; 1:23–30. DOI: 10.1016/j.cobme.2017.02.003
5. Koizumi S., Hirayama Y., Morizawa Y. M. New roles of reactive astrocytes in the brain; an organizer of cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 2018; 119(10):107–114. DOI: 10.1016/j.neuint.2018.01.007
6. Степанов С. С., Макарьева Л. М., Акулинин В. А. и др. Сопоставление иммуногистохимического и ультраструктурного изучения реакции аксональных терминалей сенсомоторной коры белых крыс на перевязку общих сонных артерий // Журнал анатомии и гистопатологии. 2022. Т. 11. № 3. С. 65–74. DOI: 10.18499/2225-7357-2022-11-3-65-74
7. Макарьева Л. М., Акулинин В. А., Степанов С. С., Шоронова А. Ю., Авдеев Д. Б., Коржук М. С. Морфологическое и морфометрическое описание нейронов сенсомоторной коры головного мозга крыс после перевязки общих сонных артерий // Журнал анатомии и гистопатологии. 2022. Т. 11. № 1. С. 49–58. DOI: 10.18499/2225-7357-2022-11-1-49-58
8. Шоронова А. Ю., Акулинин В. А., Коржук М. С., Степанов С. С., Макарьева Л. М., Цускман И. Г., Гириш А. О. Морфологическая характеристика нейронов сенсомоторной коры и оценка психоневрологического статуса крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы (сообщение 1) // Политравма. 2023. № 1. С. 72–82.
9. Кинзерский А. А., Шоронова А. Ю., Коржук М. С., Акулинин В. А., Макарьева Л. М. Патент РФ № 2788904; 2021.
10. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press; 2005.