

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.18-005.4-001

Степанов С.С., Кошман И.П., Шоронова А.Ю., Калиничев А.Г., Акулинин В.А., Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Маркелова М.В.

Структурные основы изменения межнейронной коммуникации нейронов поля CA₃ гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, 644099, Омск, Россия, ул. Ленина, д. 12

Цель – изучение пирамидных нейронов поля CA₃ гиппокампа белых крыс в динамике после тяжелой черепно-мозговой травмы (ТЧМТ).

Методы. ТЧМТ моделировали под наркозом с помощью свободно падающего груза массой 200–250 г с высоты 50 см на теменно-затылочную область. Гиппокамп изучали в контроле ($n=5$), через 1, 3, 5, 7 и 14 сут после ТЧМТ ($n=25$). Общую оценку состояния нейронов поля CA₃ проводили на препаратах окрашенных гематоксилином-эозином, численную плотность нейронов – при окраске по Нисслю, цитоскелет нейронов изучали с помощью реакции иммунотипирования *нейрон-специфического структурного белка (MAP-2)*, синаптические терминалы – иммунотипирования синаптофизина (*p38*). Для визуализации MAP-2 нейронов и p38 синаптических терминалов использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Морфометрический анализ проводили на цветных растровых и бинарных изображениях с использованием плагинов программы ImageJ 1.52s. Определяли относительную площадь зон отека-набухания, численную плотность пирамидных нейронов, количество дистрофически и некробиотически измененных нейронов, общую и относительную площадь синаптических терминалов.

Результаты. Через 1 сут после ТЧМТ нарастали явления отека-набухания, увеличивалось количество дистрофически и некробиотически измененных нейронов, уменьшалась общая и относительная площадь терминалов. В течение 14 сут общая плотность нейронов уменьшилась на 31%. Параллельно активировались механизмы нейро- и синаптической пластичности, в результате чего восстанавливался цитоскелет поврежденных нейронов и увеличивалось количество межнейронных синапсов (в 1,32 раза выше контроля).

Заключение. Восстановление структур межнейронной коммуникации происходило на фоне уменьшения общей численной плотности пирамидных нейронов. Выявленные изменения рассматриваются как основа перманентной компенсаторно-восстановительной реорганизации межнейронных отношений гиппокампа на фоне вторичной ишемии головного мозга.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; CA₃ гиппокампа; нейроны, синапсы, цитоскелет; иммуногистохимия; морфометрия; крысы Wistar

Для цитирования: Степанов С.С., Кошман И.П., Шоронова А.Ю., Калиничев А.Г., Акулинин В.А., Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Маркелова М.В. Структурные основы изменения межнейронной коммуникации нейронов поля CA₃ гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 22-34.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.22-34

Участие авторов: морфометрический и информационно-математический анализ, написание текста, иллюстративный материал, обсуждение результатов исследования – Степанов С.С.; эксперимент, уход за животными, забор материала, приготовление препаратов, обсуждение результатов исследования – Кошман И.П.; эксперимент, уход за животными, забор материала, обсуждение результатов исследования – Шоронова А.Ю.; разработка концепции эксперимента – Калиничев А.Г.; эксперимент, забор материала, написание текста, обсуждение результатов исследования – Акулинин В.А.; эксперимент, забор материала – Степанов А.С.; фотографирование препаратов, создание базы данных – Авдеев Д.Б., Маркелова М.В.

Для корреспонденции: Авдеев Дмитрий Борисович, e-mail: avdeev86@inbox.ru

Финансирование. Данная работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» №14 от 15.12.2017 г. и внутреннего гранта ФГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета №574 от 24.11.2017 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.06.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Stepanov S.S., Koshman I.P., Shoronova A.Yu., Kalinichev A.G., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Avdeev D.B., Markelova M.V.

The structural base for changes in the interneuronal communication of CA3 neurons in the hippocampus of white rats after severe traumatic brain injury

Omsk State Medical University,
Lenina Str. 12, Omsk 644099, Russian Federation Russian

Aim. To study changes in hippocampal CA3 pyramidal neurons of white rats after severe traumatic brain injury (STBI).

Methods. STBI was modeled with a free-falling weight (200-250 g) impact. The hippocampus was studied in control rats ($n=5$), 3, 5, 7, and 14 days after STBI ($n=25$). The CA3 field neurons were examined on preparations stained with hematoxylin-eosin and the number of neurons was determined with Nissl staining. The neuronal cytoskeleton was studied by immunotyping of the neuron-specific structural protein MAP-2, and synaptic terminals were studied by immunotyping of synaptophysin ($p38$). Neuronal MAP-2 and $p38$ were visualized with a multimeric Novolink™ (DAB) Polymer Detection Systems kit (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Great Britain). Morphometric analysis was performed on color raster and binary images using ImageJ 1.52s plugins to determine the relative area of edema and swelling zones, number density of pyramidal neurons, content of dystrophic and necrobiotically altered neurons, and total and relative areas of synaptic terminals.

Results. On the next day after STBI, manifestations of edema and swelling and the content of dystrophic and necrobiotically altered neurons were increased whereas the total and relative areas of terminals were decreased. In 14 days, the total density of neurons decreased by 31%, which was in parallel with activation of mechanisms for neuro- and synaptic plasticity. As a result, the cytoskeleton of damaged neurons recovered, and the content of interneuronal synapses increased 1.32 times compared to the control.

Conclusion. The structural recovery of interneuronal communication was associated with a decrease in the total number density of pyramidal neurons. These changes were regarded as a base for permanent compensatory and restorative reorganization of hippocampal interneuronal relations in secondary cerebral ischemia.

Keywords: traumatic brain injury; CA3 hippocampus; neurons, synapses, cytoskeleton; immunohistochemistry; morphometry; Wistar rats

For citation: Stepanov S.S., Koshman I.P., Shoronova A.Yu., Kalinichev A.G., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Avdeev D.B., Markelova M.V. The structural base for changes in the interneuronal communication of CA3 neurons in the hippocampus of white rats after severe traumatic brain injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 22-34. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.22-34

Contribution of authors: morphometric and information-mathematical analysis, text writing, illustrative material, discussion of research results – Stepanov S.S.; experiment, animal care, material sampling, preparation of preparations, discussion of research results – Koshman I.P.; experiment, caring for animals, sampling of material, discussion of research results – Shoronova A.Yu.; development of the concept of the experiment – Kalinichev A.G.; experiment, material sampling, text writing, discussion of research results – Akulinin V.A.; experiment, material sampling – Stepanov A.S.; photographing preparations, creating a database – Avdeev D.B., Markelova M.V.

For correspondence: **Dmitry B. Avdeev**, candidate of veterinary science, senior lecturer of the department of histology, cytology and embryology, 12 Lenin str., Omsk, 644099, Russian Federation, E-mail: avdeev86@inbox.ru

Acknowledgment. This study was supported by the UMNIC Program of the Foundation for Assistance to Innovations grant #14 of 15.12.2017 and the Omsk State Medical University in-house grant # 574 of 24.11.2017.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Stepanov S.S., <https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

Koshman I.P., <https://orcid.org/0000-0002-9763-2981>

Akulinin V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

Stepanov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-8392-9514>

Avdeev D.B., <https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>

Markelova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-5356-9669>

Received 29.06.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Гиппокамп является частью лимбической системы, играющей важную роль в обучении и хранении памяти, регуляции эмоций, сна, бодрствования, пространственной ориентации и фильтрации важной информации [1-3]. В связи с этим она привлекает

внимание исследователей, изучающих механизмы развития когнитивного дефицита при различных патологических состояниях, включая дегенеративные заболевания, ишемию и травму головного мозга [4-7].

Цито-, дендро- и синаптоархитектоника поля CA₃ гиппокампа хорошо изучены. Пирамидные нейроны

этого поля имеют мощные короткие апикальные дендриты, которые разделяются недалеко от перикариона, покрыты гигантскими шипиковыми выростами и образуют синаптические контакты с гигантскими терминалями аксонов гранулярных нейронов зубчатой фасции (мшистыми волокнами). Гигантские синапсы локализируются в *stratum lucidum* и на some пирамидных нейронов. От слоя пирамидных нейронов CA₃ отходят так называемые коллатерали Шаффера, которые образуют синапсы с апикальными дендритами пирамидных нейронов CA₁. Упомянутые связи являются основными ассоциативными путями гиппокампа (трисинаптический путь), которые соединяют воедино его основные элементы. Установлено, что именно поле CA₃ гиппокампа является точкой конвергенции потоков информации от ассоциативной коры и ствола мозга [8-10]. Нейроны гиппокампа отличаются не только структурным, но и генетическим полиморфизмом, что определяет особенности их ответной реакции на патологические воздействия [4]. Для нейронов гиппокампа характерна высокая синаптическая пластичность, которая обеспечивает адаптивную, компенсаторную и репаративную реорганизацию межнейронных отношений, подстраивая пространственную сетевую коммуникацию пирамидных нейронов гиппокампа к конкретным условиям [11].

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) занимает 3-е место среди причин смерти в РФ, является ведущей причиной смерти и инвалидности у лиц до 40-45 лет. Острые и хронические последствия ЧМТ разной этиологии хорошо изучены [12]. ЧМТ оказывает влияние на все отделы и структуры головного мозга в результате первичного травматического и вторичного ишемического воздействия [13-18].

Даже незначительные повреждения гиппокампа при легкой ЧМТ неизбежно приводят к когнитивной дисфункции и нарушениям пространственной ориентации [4]. Это связано с тем, что в ответ на травму и вторичные нарушения микроциркуляции, энергетического, водного и ионного обмена происходит ряд последовательных конформационных изменений (гидратации белков) цитоскелета нейронов (перикариона, дендритов, аксонов) и синапсов (пресинаптическая решетка, постсинаптическое уплотнение), которые блокируют физико-химические основы образования и движения нервного импульса, а также механизмы пульсации нейронов и перманентной физиологической пространственной реорганизации межнейронных отношений [17, 19, 20].

В этой связи важным является изучение последствий закрытой ТЧМТ в гиппокампе, который не име-

ет непосредственного контакта с травмирующим агентом, но, по данным литературы, оказывается вовлеченным в патологический процесс формирования посттравматической энцефалопатии. Особое значение в анализе изменений межнейронной коммуникации нейронов имеют данные о состоянии структур, участвующих в формировании синаптических связей — аксональных терминалях (селективное выявление с помощью типирования на синаптофизин и дендритах (селективное выявление с помощью реакции на белок, ассоциированный с микротрубочками). Первые являются пре-, вторые — постсинаптической частью синапсов [5, 6, 18].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных морфологии гиппокампа головного мозга белых крыс в норме и при различных патологических состояниях, особенности структур коммуникации пирамидных нейронов поля CA₃ после тяжелой черепно-мозговой травмы изучены недостаточно.

Цель исследования — изучение в динамике после ТЧМТ изменений пирамидных нейронов поля CA₃ гиппокампа и систем их межнейронной коммуникации (отростки нейронов, терминали синапсов, цитоскелет).

Методика

Исследование выполнено в ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрено этическим комитетом университета (протокол №107 от 2 октября 2018 года). В качестве экспериментальных животных использовали 30 половозрелых крыс Wistar (самцы масса 270–350 г. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, эксперимент проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77 №755) и с рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

Для изучения структурно-функционального состояния нейронов и синапсов поля CA₃ гиппокампа головного мозга в посттравматическом периоде моделировали тяжелую черепно-мозговую травму (ТЧМТ, $n=25$). Через 5 мин после введения Zoletil 100 (5–7 единиц) с помощью специальной рельсовой стойки нанесли удар свободно падающим грузом массой 200–250 г с высоты 50 см на теменно-затылочную область. Контролем служили интактные крысы ($n=5$).

Через 1, 3, 5, 7 и 14 сут (по 5 животных на каждый срок) после травмы (под наркозом Zoletil 100) голов-

ной мозг фиксировали перфузией. Последовательно вводили 100–125 мл раствора 0,9% NaCl и Фрагина (5000 ЕД) и 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Мозг извлекали и хранили в фиксаторе при температуре 3–5 °С. Далее материал заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®) с помощью автомата «СТР 120». Серийные фронтальные срезы (4 мкм) готовили на санном микротоме HM 450 (Thermo) на уровне (-) 2,40 и (-) 3,36 мм от Bregma [21].

Общую качественную оценку поля CA₃ проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином, численную плотность пирамидных нейронов определяли при окраске по Ниссли (учитывали только нейроны с видимым ядрышком), цитоскелет нейронов изучали с помощью иммунотипирования нейрон-специфического структурного белка, ассоциированного с микротрубочками (MAP-2). Он обратимо связывается с микротрубочками цитоскелета, способствуя их полимеризации, придает им устойчивость против деполимеризующих воздействий, а также вызывает образование пучков. Использовались поликлональные кроличьи антитела (разведение 1:400; ab32454, abcam, США). Синаптические терминалы изучали с помощью иммунотипирования синаптофизина (p38), который связан с синаптическими пузырьками и локализуется исключительно в пресинаптических терминалах. В качестве первичных использовали моноклональные (клон 27G12) мышинные антитела (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Для иммунотипирования срезы размещали на полилизинных стеклах. Для визуализации MAP-2 нейронов и p38 синаптических терминалов использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). После реакции с первичными антителами срезы последовательно инкубировали с вторичными антителами, затем хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол.

Препараты фотографировали (микроскоп Leica DM 1000, объектив ×100, камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4×1,4 μm), изображения сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей). Для достижения максимальной контрастности и четкости изображения проводили коррекцию с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость) в Photoshop CC. Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.52s. На каждый срок использовали по 50 случайно выбран-

ных полей зрения (область интереса) CA₃ гиппокампа. Цветные изображения (иммунотипирование p38) трансформировали в бинарные, на которых определяли («Analyze Particles») относительную площадь и численную плотность синаптических терминалов (на 1 мм²) в *stratum lucidum* и слое пирамидных нейронов CA₃ (область интереса: 25×25 мкм; объектив: ×100). Для стандартизации измерений численную плотность пирамидных нейронов определяли по наличию ядрышек на срезах перикарионов (окраска по Ниссли; область интереса: 130×70 мкм; объектив ×100).

На цветных изображениях (окраска гематоксилином&эозином) для выявления зон отека-набухания (максимальная яркость пикселей – Maxima) нервной ткани использовали плагин-фильтр «Find Maxima» из программы ImageJ 1.52s (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). Неравномерность распределения зон максимальной яркости (ЗМЯ) оценивали с помощью алгоритма водораздела “Segmented Particles”, примененного к значениям яркости изображения. На полученных в результате работы этого фильтра масках изображений определяли («Analyze Particles») относительную площадь зон максимальной яркости, которые затем переводили в объем (на 1 мм³).

Для проверки статистических гипотез из полученных массивов графических изображений формировали вариационные ряды: 1) на каждый срок фотографировали около 200 полей зрения гиппокампа (объектив: ×100); 2) с помощью специально написанного макроса в программе ImageJ выделяли на этих фотографиях области интереса: 25×25 мкм и помещали их в стеки; 3) затем осуществляли процедуру рандомизации зон интереса с помощью генератора случайных чисел (Statistica 8.0) и отбирали на каждый срок по 50 изображений. На этих изображениях проводили морфометрический анализ с получением цифрового материала. Таким образом, в итоге каждый вариационный ряд, отражающий один срок по изученным переменным, состоял из 50 измерений. Характер распределения вариационных рядов оценивали с помощью теста Shapiro-Wilk (Statistica 8.0) и квантильных графиков (среда R). Некоторые вариационные ряды не соответствовали условиям применения методов параметрической статистики. Поэтому проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими методами: парное сравнение – критерий Манна-Уитни, множественное сравнение – аналог однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA Краскела-Уоллиса). Количественные данные в работе представлены как медиана (50% квартиль – мера центральной тенденции), 25–75% квартили, диапазоны без выбросов (Max-Min)

и с выбросами — меры разброса изученных величин. Медиана является нечувствительной к распределению и наиболее подходит для анализа данных подобного

типа [22]. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

В группе контроля на фронтальных срезах гиппокампа, окрашенных гематоксилином&эозином и по Нисслию в CA_3 преобладали типичные нормохромные пирамидные нейроны (до 25 мкм в диаметре) с крупным ядром, содержащим большое ядрышко (2,0–3,5 мкм). Признаков гидропической и белковой дистрофии нейронов выявлено не было. Нейропил молекулярного слоя, периваскулярные и перинейрональные зоны представлены однородным субстратом без структурных проявлений отека-набухания (рис 1, а).

При иммунотипировании на *MAP-2* перикарионы и отростки пирамидных нейронов равномерно заполнены маркером (рис 1, б). Вокруг перикарионов и дендритов пирамидных нейронов располагалось большое количество крупных *p38*-позитивных синаптических терминалей в виде круглых коричневых гранул (частиц) и их конгломератов (рис 1, б). Площадь срезов одной *p38*-позитивной частицы варьировала в пределах 1,5–6,6 мкм². Максимальное скопление этих терминалей в поле CA_3 отмечено в особой зоне (*stratum lucidum*), которая состояла из апикальных участков дендритов пирамидных нейронов и гигантских синапсов, сформированных терминалями аксонов мшистых волокон зубчатой фасции. В *stratum radiatum* и *lacunosum* молекулярного слоя поля CA_3 при иммуногистохимическом исследовании гигантские терминали встречались редко.

После ТЧМТ появлялись типичные структурные признаки гидропической (вакуолизированные нейроны), белковой дистрофии (гиперхромные нейроны, часть из которых с признаками сморщивания), хроматолиза (гипохромные нейроны и клетки-тени), отека-набухания перикарионов, крупных дендритов, нейропиля, отростков астроцитов и олигодендроглиоцитов (перичеселлюлярный и периваскулярный). Количество глиоцитов, по сравнению с контролем, увеличивалось в 2–3 раза (рис 2, а, б, в, г). Топографически изменения носили диффузно-очаговый характер.

Содержание неизмененных нормохромных нейронов в остром посттравматическом периоде уменьшалось до 20–30%. Среди дистрофически измененных нейронов преобладали гиперхромные нейроны без сморщивания и гомогенизации перикариона. В необратимо измененных гиперхромных пикноморфных нейронах отмечалась конденсация и гомогенизация хроматофильного вещества ядра и цитоплазмы,

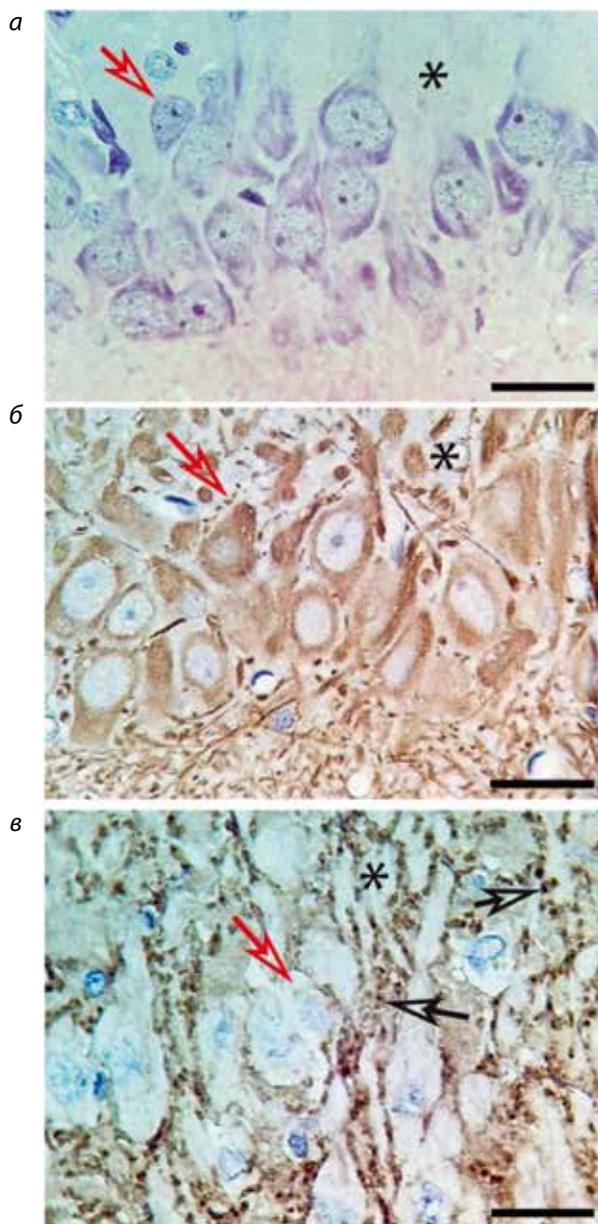


Рис. 1. Фрагменты поля CA_3 гиппокампа головного мозга белых крыс в норме: а – окраска гематоксилином-эозином, б – иммунотипирование *MAP-2*, в – иммунотипирование на *p38* (синаптофизин). Преобладают нормохромные пирамидные нейроны (а), равномерно заполненные *MAP-2*-позитивным материалом (б); вокруг перикарионов и дендритов пирамидных нейронов (в) располагается большое количество крупных *p38*-позитивных синаптических терминалей (черные стрелки). Красные стрелки – слой пирамидных нейронов.

* – *stratum lucidum*. Объектив $\times 100$; шкала – 25 мкм.

«исчезновение» ядрышка. Наибольшее количество таких нейронов выявлено через 3 и 5 сут после травмы (в некоторых очагах до 80% всех клеток) (рис. 2, б, в, г), на фоне максимального для посттравматического периода объема зон отека-набухания (рис 3, а). В этот же период отмечали большое количество (до 40–60%) нормохромных пирамидных нейронов с двумя–тремя ядрышками (рис 2, б), что, вероятно, свидетельствовало о компенсаторной активации ядер неповрежденных нейронов. Мы полагаем, что в активно функционирующих нейронах гиппокампа включались процессы адаптации белоксинтезирующей системы, которые проявлялись гипертрофией и амплификацией ядрышек. По данным литературы, это обеспечивало усиление рибосомного синтеза, регенерацию частично поврежденных и защиту функционирующих клеток. Аналогичные структурные изменения показаны нами после острой ишемии мозга [23].

Через 7 и 14 сут после ТЧМТ содержание в СА₃ нормохромных нейронов значительно увеличивалось, а гиперхромных уменьшалось (рис. 2, д, е). При этом общая численная плотность нейронов, в которых сохранялось и верифицировалось ядрышко, в течение 14 сут наблюдения (начиная с 3-х сут) статистически значимо уменьшалась (рис. 3, б). То есть, не все дистрофически измененные нейроны восстанавливались, часть из них необратимо разрушалась и, вероятно, элиминировались путем фагоцитоза. На рис. 3, б видно, что после ТЧМТ значительно увеличивались меры разброса вариационных рядов (диапазоны без выбросов и с выбросами) переменной «общая численная плотность нейронов». Это свидетельствовало о неоднородности (очагах или локусах) разрушения пирамидных нейронов – явные проявления полиморфизма одноптипных по структуре пирамидных нейронов.

По данным иммунотипирования ассоциированного с микротрубочками протеина, после ТЧМТ в СА₃

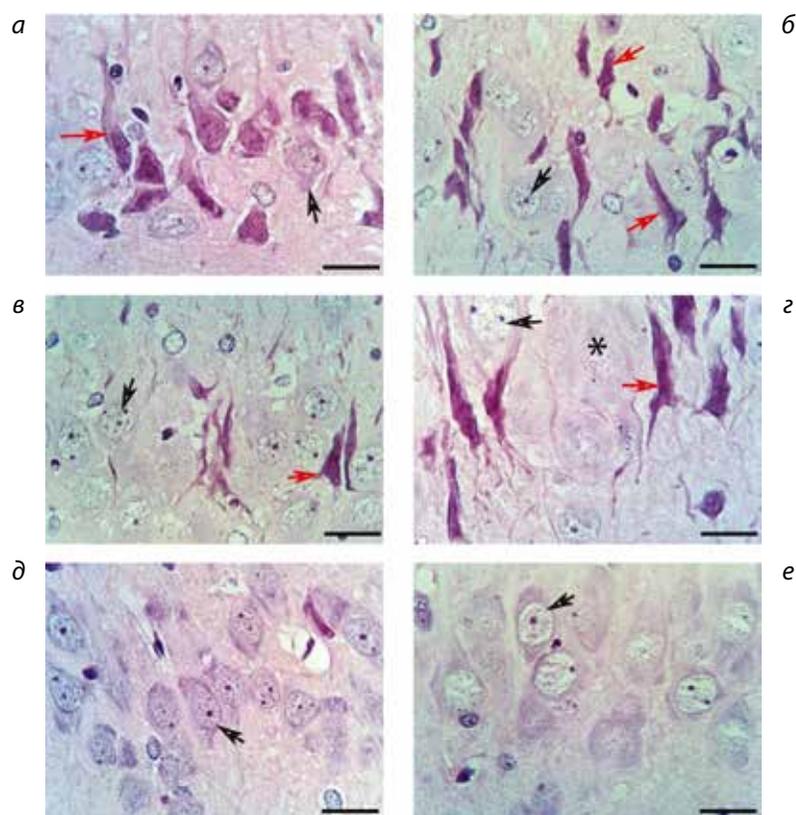


Рис. 2. Фрагменты поля СА₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а) 3 (б, в), 5 (г), 7 (д) и 14 (е) суток после тяжелой черепно-мозговой травмы: в первые 5 сут (а-г) уменьшалась доля нормохромных (черные стрелки) нейронов, появлялось большое количество гиперхромных несморщенных и пикноморфных нейронов (красные стрелки), глиальных клеток (а-в), отмечались гипохромные нейроны (*), проявления гидрической дистрофии (отек-набухание нейропиля, астроцитов, перикариона, б и в); через 7 (д) и 14 (е) сут происходило выраженное восстановление содержания нормохромных нейронов. Окраска гематоксилином-эозином; объектив $\times 100$; шкала – 25 мкм.

появлялось большое количество очагов измененных нейронов с выраженной конденсацией микротрубочек цитоскелета по периферии перикариона и в дендритах, а также с разной степенью дегидратации и сморщивания клетки в целом. Это, вероятно, свидетельствовало о конформационных изменениях белков цитоскелета в перикарионе и отростках пирамидных нейронов. Максимальная степень конденсации MAP-2-позитивного материала (плотность хромогена по яркости пикселей) отмечена в сморщенных гиперхромных нейронах через 3, 5 и 7 сут (мода = 62–68, в несморщенных нейронах мода = 90–120). Наиболее часто крупные очаги сморщенных нейронов с высокой плотностью хромогена встречались через 3 сут после травмы (рис. 4, а-в). Значительное восстановление гидратации белков цитоскелета гиперхромных нейронов происходило, вероятно, только через 14 сут после травмы, когда доля клеток с выраженной гиперхромией и конденсацией микротрубочек цитоскелета существенно уменьшалась (рис. 4, е).

Таким образом, после ТЧМТ в поле CA₃ гиппокампа были отмечены очаговые изменения плотности MAP-2-позитивного материала цитоскелета пирамидных нейронов. В сморщенных гиперхромных клетках отмечалась выраженная конденсация цитоскелета, связанная с разрушением и дегидратацией его белков. Это неизбежно приводило к нарушению функций цитоскелета части нейронов и блокировало передачу импульсов по их отросткам. Найденные изменения цитоскелета в той или иной степени сохранялись на про-

тяжении всего изученного постишемического периода, но в большей степени проявлялись через 1, 3 и 5 сут. Именно в это время были выявлены максимальные проявления отека-набухания (рис. 3, а) и большое количество некробиотически измененных нейронов (рис. 2, а-г). Далее (7 и 14 сут) происходило восстановление цитоскелета основной массы несморщенных нейронов, а необратимо измененные сморщенные нейроны, вероятно, удалялись частями посредством фагоцитоза астроцитами и микроглиоцитами.

Деструктивные и репаративные изменения цитоскелета пирамидных нейронов CA₃ гиппокампа после ТЧМТ сопровождались статистически значимыми изменениями численной плотности и относительной площади крупных и гигантских терминалей в *stratum lucidum*. Эти терминали надежно верифицировались с помощью иммунотипирования на синаптофизин (*p38*) синаптических пузырьков, а их большие размеры позволяли точно оценить динамику изменения количества и площади терминалей в посттравматическом периоде (рис. 5, б, 7).

В остром периоде после травмы появлялись очаги с низкой и высокой плотностью частиц *p38*-позитивного материала. Низкая плотность соответствовала зонам CA₃ с высоким содержанием гиперхромных нейронов (рис. 5, а, в), а высокая плотность – зонам с преобладанием нормохромных нейронов (рис. 5, б, г).

Морфометрическая оценка синаптических терминалей проводилась по количеству и площади меток *p38* на бинарных изображениях. Через 1 сут после ТЧМТ про-

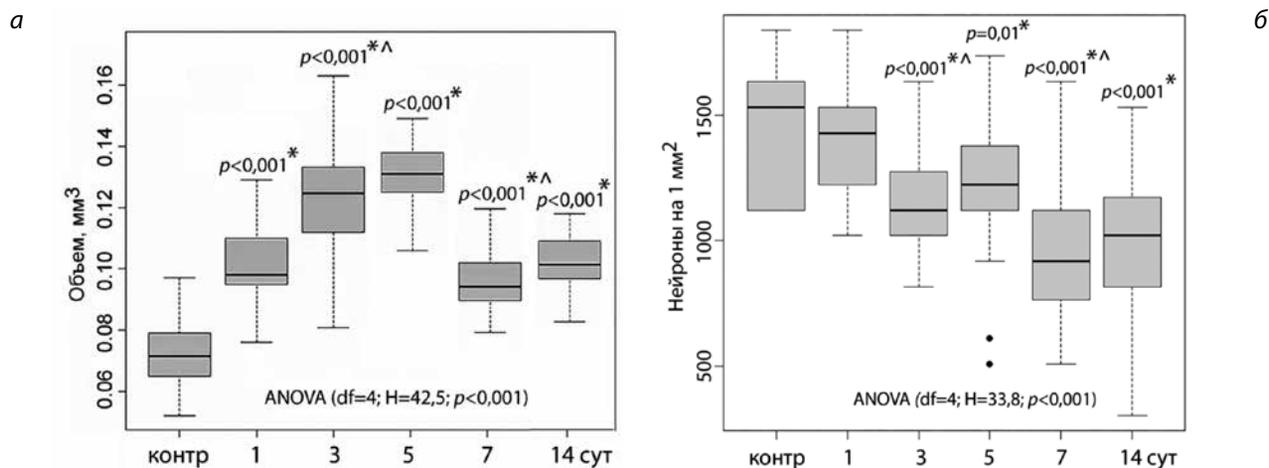


Рис. 3. Объем зон отека-набухания (а) и численная плотность пирамидных нейронов (б) в контроле и в посттравматическом периоде: через 3, 5, 7 и 14 сут происходит статистически значимое уменьшение плотности нейронов. * – различия в сравнении с контролем; ^ – с предыдущим сроком статистически значимы (критерий Манна-Уитни). ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, множественное сравнение переменных по срокам исследования. Материал представлен как медиана (50%), 25–75% квартили (бокс), диапазон без (Max-Min) и с выбросами (·).

исходило смещение в сторону увеличения доли полей зрения с низкой площадью меток (рис. 6). Это свидетельствовало о разрушении части синаптических терминалей (рис. 7, а) и содержащегося в них *p38* (рис. 7, б).

Однако уже через 3 сут после травмы происходило компенсаторное увеличение общей численной

плотности и площади *p38* (рис. 7, а, б). Увеличение численной плотности терминалей было нестабильным: через 5 сут показатель вновь снижался, затем (7 сут) увеличивался, через 14 сут достигал уровня контроля (рис. 7, а). Все это, вероятно, свидетельствовало об активации процесса синаптической пла-

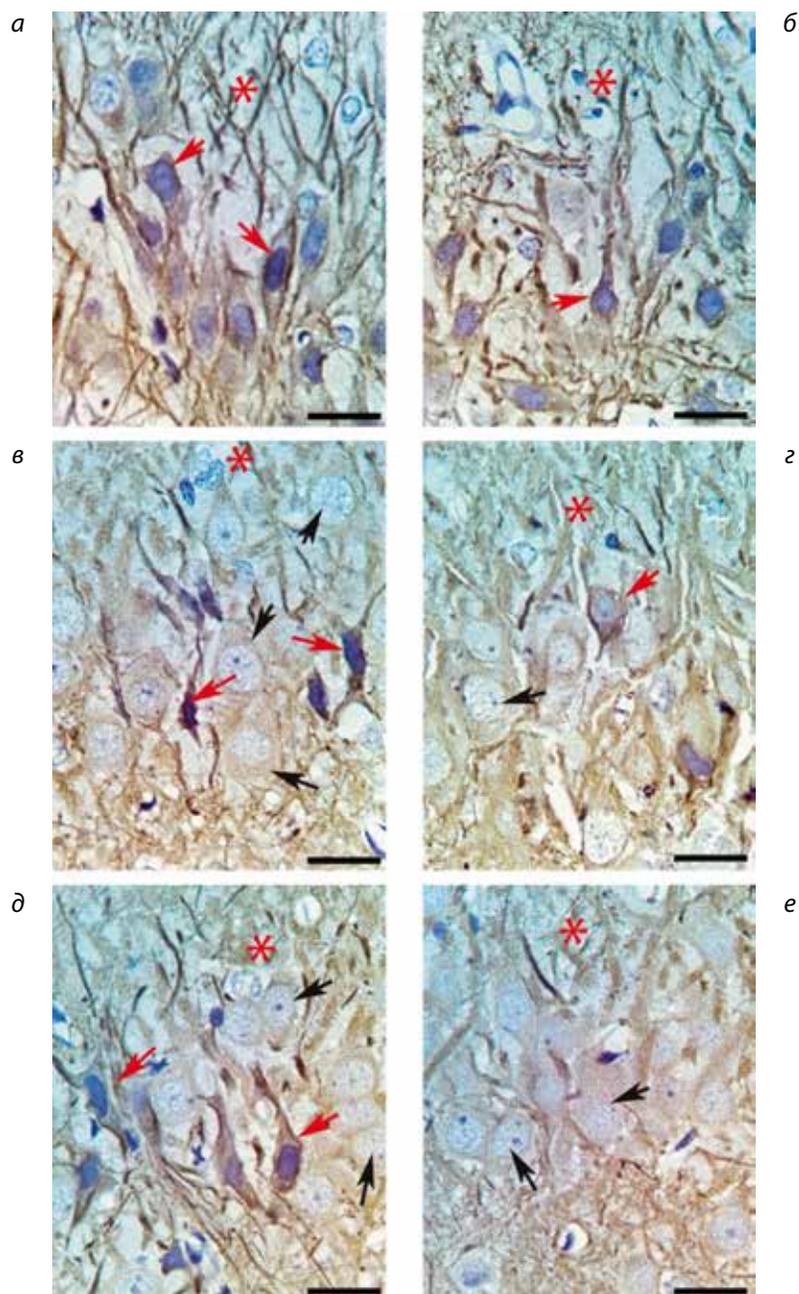


Рис. 4. Фрагменты поля CA₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а) 3 (б, в), 5 (г), 7 (д) и 14 (е) суток после тяжелой черепно-мозговой травмы: увеличивалась доля нейронов (красные стрелки) с выраженной конденсацией микротрубочек цитоскелета по периферии перикариона и дендритах с разной степенью сморщивания клетки; через 14 (е) сут происходило значительное восстановление гидратации цитоскелета. Черные стрелки – нормохромные нейроны, * – *stratum lucidum*. Окраска – реакция на MAP-2; объектив ×100; шкала – 25 мкм.

стичности на фоне вторичной ишемии и деструкции синапсов.

Таким образом, реорганизация межнейронных отношений в CA₃ гиппокампа после ТЧМТ – длительный волнообразный процесс, сочетающий в себе единство восстановления одних и деструкцию других синапсов. Реорганизация синапсов происходила на фоне отека-набухания нервной ткани, тинкториальных изменений нейронов, разрушения и конденсации их цитоскелета в перикарионе и отростках. Вполне вероятно, что гетерохронность и очаговость изменения количества межнейронных синапсов в посттравматическом периоде обусловлена полиморфизмом пирамидных нейронов CA₃ – особенностями их реакции, чувствительности, устойчивости и пластичности.

Обсуждение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что после ТЧМТ в поле CA₃ гиппокампа увеличивалась степень гидратации нервной ткани, изменялись тинкториальные свойства нейронов, разрушались дендриты и синаптические терминали. Изменения были мелкоочаговыми (мозаичными), имели гетерохронный и гетероморфный характер. Вполне вероятно, что выявленный гетероморфный характер изменений нейронов мог быть связан с нейрохимическими различиями морфологически однотипных пирамидных нейронов популяции поля CA₃ гиппокампа. По данным литературы, функциональный и генетический полиморфизм одинаковых нейронов имеет ре-

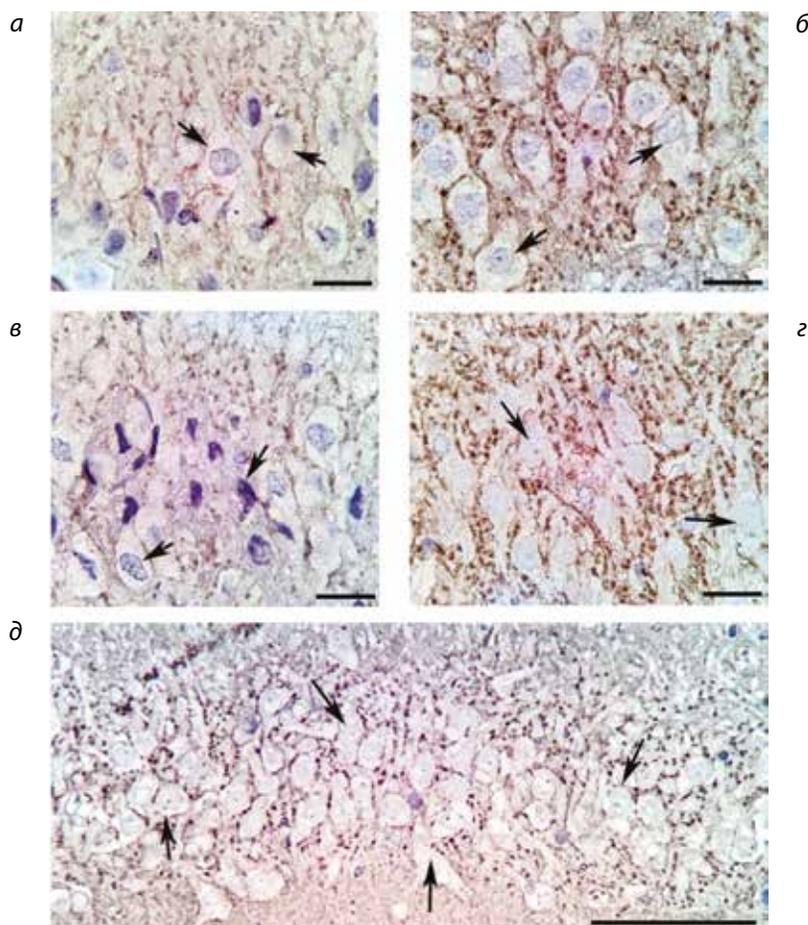


Рис. 5. Фрагменты поля CA₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а) 3 (б), 5 (в), 7 (z) и 14 (д) сут после тяжелой черепно-мозговой травмы: через 1 сут (а) отмечалось явное уменьшение плотности и яркости p38-позитивных структур (синаптические терминали), через 3 сут (б) появлялось большое количество крупных интенсивно окрашенных синаптических терминалей вокруг перикарионов и отростков пирамидных нейронов (стрелки), через 5 сут (в) сохранялись очаги низкой плотности терминалей в зонах гиперхромных нейронов (стрелка), через 7 (z) и 14 (д) сут происходило восстановление распределения и интенсивности окраски терминалей в stratum lucidum. Окраска – иммунотипирование p38; объективы $\times 100$ (а-з) и $\times 40$ (д); шкала (а-з) – 25 мкм, шкала (д) – 100 мкм.

шающее значение для объяснения феномена селективности их повреждения [4].

По нашим данным, после ТЧМТ на уровне *stratum lucidum* даже при наличии достаточного количества синапсов происходило блокирование передачи импульсов в результате неполного восстановления цитоскелета части пирамидных нейронов, необходимого для проведения импульса и межнейронной коммуникации энторинальной коры, гиппокампа, зубчатой фации. Известно, что главным условием восстановления межнейронных связей является наличие нейромедиаторов в терминалях и восстановление конформационного состояния белков цитоскелета дендритов [18-20, 24]. В поле CA₃ гиппокампа после ТЧМТ в течение 14 сут наблюдения это условие полностью не соблюдалось. Например, через 7 сут происходило значительное (выше контроля) увеличение численной плот-

сти синаптических терминалей, восстановление содержания *p38* и *MAP-2* в целом (по медиане). Однако в это время сохранялись очаги с признаками структурно-функциональной дисфункции систем межнейронной коммуникации. То есть, несмотря на восстановление конформационного состояния белков цитоскелета в одних нейронах, в других сохранялась конденсация цитоскелета. Полное стабильное восстановление всех структур межнейронной коммуникации нейронов в

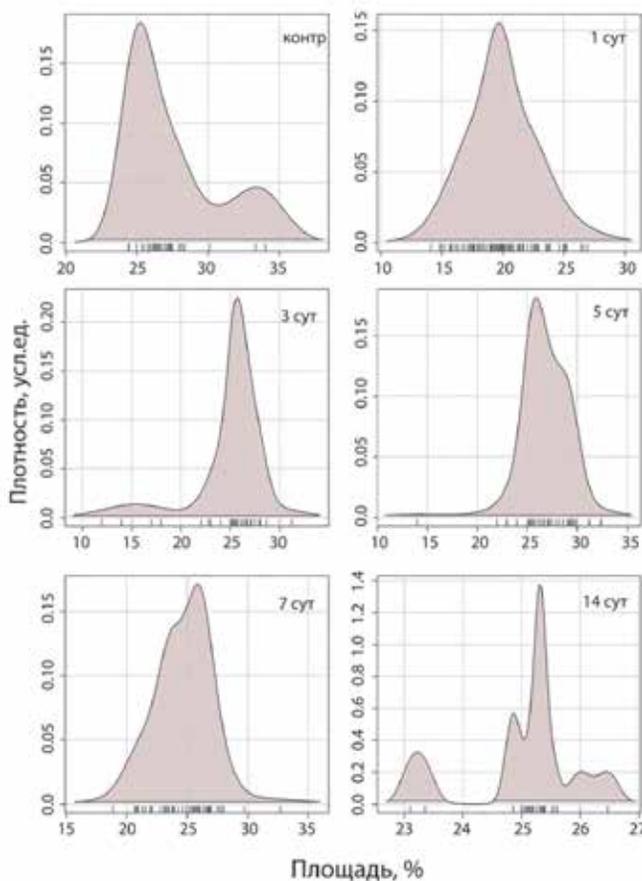


Рис. 6. Распределение полей зрения CA₃ гиппокампа по относительной общей площади меченых (*p38*) гигантских терминалей *stratum lucidum* в контроле и в посттравматическом периоде: через 1 сут происходит смещение в сторону увеличения доли полей зрения с меньшей (15–20%) площадью.

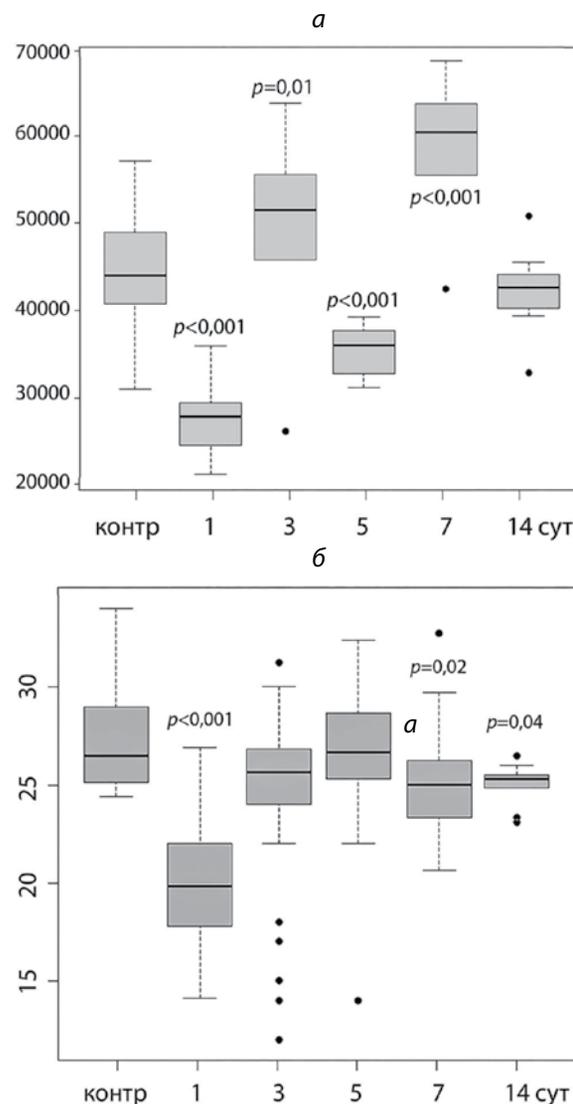


Рис. 7. Общая численная плотность (на 1 мм² плоскости среза, *a*) и относительная площадь (*b*) меченых (*p38*) гигантских терминалей *stratum lucidum* в контроле и в посттравматическом периоде: через 1 сут происходит разрушение части синапсов с уменьшением плотности и общей площади их терминалей. Материал представлен как медиана (50%), 25–75% квантили (бокс), диапазон без (Max-Min) и с выбросами (·).

поле CA₃ гиппокампа после ТЧМТ, вероятно, требовало значительно большего времени и происходило волнообразно на фоне перманентного разрушения какой-то части синапсов. Имеются работы, согласно которым восстановление структурно-функционального состояния нервной ткани головного мозга до контрольного состояния после ишемического повреждения невозможно в принципе. Происходит только приспособление к потере нейронов за счет репаративной синаптической пластичности и постоянной реорганизации сохранившихся нейронных сетей [18]. По данным D. Arneson et al. (2019), это может быть связано с тем, что структурно однородные и однотипные популяции нейронов CA₁ или CA₃ обладают выраженным функциональным и генетическим полиморфизмом [4]. Поэтому уже через 1 сут после травмы чувствительные к ишемии нейроны подвергались необратимым изменениям, а частичное функциональное восстановление гиппокампа происходило за счет реорганизации связей сохранившихся более устойчивых нейронов. То есть, восстановление происходило через образование избыточного количества терминалей с последующей реорганизацией старых и формированием новых нейронных сетей. В пользу этого свидетельствуют наши данные об увеличении общей численной плотности синаптических терминалей через 3 и 7 сут после травмы выше контрольного уровня. В это же время также выявлено увеличение доли нейронов с двумя и более ядрышками, что свидетельствовало о постишемической компенсаторной активации нервных клеток [23].

По данным литературы, нейропластичность предполагает не только образование новых синапсов, но и напротив – избавление от их излишков. Первая называется пластичностью Геббеса, а вторая – гомеостатической пластичностью. Соответственно, первая давала возможность мозгу строить ассоциативные связи (запоминать), а вторая поддерживать гомеостаз путем разрушения синапсов. Новые избыточные связи могли не понадобиться и, кроме того, были способны навредить, участвуя в образовании патологических нейронных систем мозга [18, 25]. Мы полагаем, что через 1 сут после травмы синапсы поля CA₃ разрушались, через 3 и 7 сут происходило избыточное образование новых синапсов в результате активации пластичности Геббеса, а затем восстановление количества синапсов (14 сут) в результате активации гомеостатической пластичности. В совокупности эти две разновидности нейропластичности обеспечивали более тонкое структурно-функциональное восстановление межнейронных взаимоотношений поля CA₃ после ЧМТ. По данным V.L. Zhang и соавт. (2018), не только повреждение синапсов, но и сам про-

цесс реорганизация межнейронных отношений после гибели части нейронов приводит к значительным длительным нарушениям баланса возбуждающих и тормозных систем гиппокампа [26]. Результаты этой и нашей работ свидетельствуют о том, что через 7 суток после травмы не происходило восстановления межнейронных отношений, до уровня, обеспечивающего нормальное функционирование гиппокампа. Поэтому, несомненно, для предотвращения формирования устойчивых патологических систем мозга, по типу эпилептических очагов на базе гиперактивных нейронов гиппокампа, необходим поиск способов коррекции дисбаланса возбуждающих и тормозных систем гиппокампа. Перспективными в этом направлении, вероятно, являются нейротропные соединения, регулирующие процессы нейропластичности и передачи нервного импульса.

Заключение

1. В остром периоде после тяжелой черепно-мозговой травмы в поле CA₃ гиппокампа увеличивались степень гидратации нервной ткани (гидропическая дистрофия), содержание гиперхромных несморщенных и пикноморфных нейронов (белковая дистрофия и коагуляционный некроз), разрушались синапсы, дендриты и перикарианы пирамидных нейронов. Изменения имели диффузно-очаговый гетерохронный и гетероморфный характер. Параллельно происходило восстановление конформационного состояния белков цитоскелета отдельных нейронов, активировались процессы образования новых синапсов. При этом численная плотность p38-позитивных терминалей статистически значимо превышала контрольный уровень через 3 и 7 сут после травмы. До контрольного уровня этот показатель восстанавливался только через 14 сут наблюдения.

2. Выявленные изменения необходимо учитывать при оценке межнейронной коммуникации нейронов и компенсаторно-восстановительной перестройки нейронных сетей гиппокампа в посттравматическом периоде. Таким образом, структурно-функциональное восстановление CA₃ происходило путем длительной реорганизации межнейронных отношений на фоне сохранения дистрофически/некробиотически измененных нейронов и снижения общей численной плотности нейронов. Восстановление межнейронных отношений сохранившихся нейронов происходило путем образования избыточного количества синаптических терминалей с последующей их частичной элиминацией.

3. Полученные данные можно использовать при изучении феномена селективного повреждения и восстановления нейронов, структурных механизмов дисбаланса возбуждающих и тормозных систем гиппокам-

па, а также закономерностей формирования устойчивых патологических систем мозга после травмы у экспериментальных животных и у человека.

Литература

(п.п. 1-4; 7-17; 21; 25; 26 см. References)

5. Степанов А.С. Сравнительная характеристика синаптоархитектоники неокортекса, гиппокампа и миндалевидного комплекса белых крыс в норме и после острой ишемии. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2017; 6(4): 47–54.
6. Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б., Горбунова А.В. Коммуникация нейронов поля СА₃ гиппокампа головного мозга белых крыс после острой ишемии. *Общая реаниматология*. 2018; 14(5): 38–49.
18. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. *Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты)*. М.: Директ-Медиа; 2014.
19. Яшкичев В.И. Изменение гидратации белков цитоскелета нейрона – механизм образования и движения нервного импульса. *Социально-экологические технологии*. 2015; Т.1-2: 58–64.
20. Яшкичев В.И. Пульсации клеток – основа жизни. *Евразийское Научное Объединение*. 2015; 1(5): 45–9.
22. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. 2-е изд. Издательство Питер; 2003.
23. Степанов С.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Степанов А.С., Горбунова А.В. Структурно-функциональная реорганизация ядрышкового аппарата нейронов неокортекса, архикортекса и базальных ганглиев головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2018; 7(4): 67–74.
24. Лю Б.Н., Исмаилов С.Б., Лю М.Б. Состояния цитоскелета: связь с “кислородно-перекисными” эффектами в норме, при клеточных патологиях и апоптозе. *Биомедицинская химия*. 2008; 54(1): 58–77.

References

1. Raven F., Van der Zee E.A., Meerlo P., Havekes R. The role of sleep in re-gulating structural plasticity and synaptic strength: implications for memory and cognitive function. *Sleep Med. Rev.* 2018; Vol. 39: 3–11.
2. Spitz G., Bigler E.D., Abildskov T., Maller J.J., O’Sullivan R., and Ponsford J.L. Regional cortical volume and cognitive functioning following traumatic brain injury. *Brain Cogn.* 2013; Vol. 83: 34–44.
3. Palacios E.M., Sala-Llonch R., Junque C., FernandezEspejo D., Roig T., Tormos J.M., et al. Long-term declarative memory deficits in diffuse TBI: correlations with cortical thickness, white matter integrity and hippocampal volume. *Cortex*. 2013; Vol. 49: 646–57.
4. Arneson D., Zhang G., Ying Z. et al. Single Cell Molecular Alterations Reveal Target Cells and Pathways of Concussive Brain Injury. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 3894.
5. Stepanov A.S. Comparative characteristics of the white rats neocortex, hippocampus and amygdale complex synaptoarchitectonics in norm and after acute ischemia. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2017; 6(4): 47–54. (in Russian)
6. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Avdeev D.B., Gorbunova A.V. Neurons communication in the hippocampus of field CA₃

of the white rat brain after acute ischemia. *Obshchaya reanimatologiya*. 2018; 14(5): 38–49. (in Russian)

7. Blennow K., Brody D.L., Kochanek P.M., et al. Traumatic brain injuries. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; Vol. 2: 1–19.
8. Grieves R.M., Duvelle É., Wood E.R., Dudchenko P.A. Field repetition and local mapping in the hippocampus and the medial entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.* 2017; 118(4): 2378–88.
9. Legéndy C.R. On the ‘data stirring’ role of the dentate gyrus of the hippocampus. *Rev. Neurosci.* 2017; 28(6): 599–615.
10. Moser E.I., Moser M.B., McNaughton B.L. Spatial representation in the hippocampal formation: a history. *Nat. Neurosci.* 2017; 20(11): 1448–64.
11. Leal G., Bramham C.R., Duarte C.B. BDNF and hippocampal synaptic plasticity. *Vitam. Horm.* 2017; Vol. 104: 153–95.
12. Leo P., McCrean M. Epidemiology. In: Laskowitz D, Grant G, eds. *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group; 2016.
13. Van den Bedem H., and Kuhl E. Molecular mechanisms of chronic traumatic encephalopathy. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 2017; Vol. 1: 23–30.
14. Harris T.C., de Rooij R., Kuhl E. The Shrinking Brain: Cerebral Atrophy Following Traumatic Brain Injury. *Ann Biomed Eng.* 2019; 47(9): 1941–59.
15. Cole J.H., Jolly A., de Simoni S., Bourke N., Patel M.C., Scott G., et al. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury. *Brain*. 2018; 141(3): 822–36.
16. Si Yun Ng, Alan Yiu Wah Lee. Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets. *Front. Cell. Neurosci.* 2019; Vol. 13: 528.
17. Stein T.D., Alvarez V.E., McKee A.C. Concussion in Chronic Traumatic Encephalopathy. *Curr Pain Headache Rep.* 2015; 19(10): 47.
18. Semchenko V.V., Stepanov S.S., Bogolepov N.N. *Brain synaptic plasticity (fundamental and applied aspects)*. [Sinaphticheskaya plastichnost’ golovnoy mozga (fundamental’nye i prikladnye aspekty)]. Moscow: Direkt-Media; 2014. (in Russian)
19. Yashkichev V.I. Change of hydration of proteins of the cytoskeleton – mechanism of creation and movement of nerve impulse. *Sotsial’no-ekologicheskie tekhnologii*. 2015; Vol. 1-2: 58–64. (in Russian)
20. Yashkichev V.I. Cell pulsations - the basis of life. *Evraziyskoe Nauchnoe Ob’edinenie*. 2015; 1(5): 45–9. (in Russian)
21. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
22. Bоровиков В. *Statistica. The art of analyzing data on a computer*. 2-nd ed. Izdatel’stvo Piter; 2003. (in Russian)
23. Stepanov S.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Stepanov A.S., Gorbunova A.V. Structural-functional reorganization of the nucleolar apparatus of neurons of the neocortex, archicortex and basal ganglia of the brain of white rats after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2018; 7(4): 67–74. (in Russian)
24. Lyu B.N., Ismailov S.B., Lyu M.B. The state of cytoskeleton and its links “oxygen-peroxide” effects in some pathologies and apoptosis. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2008; 54(1): 58–77. (in Russian)
25. Hobbiss A.F., Ramiro-Corte’s Y., Israely I. Homeostatic Plasticity Scales Dendritic Spine Volumes and Changes the Threshold and Specificity of Hebbian Plasticity. *iScience*. 2018; Vol. 8: 161–74.
26. Zhang B.L., Fan Y.S., Wang J.W., et al. Cognitive impairment after traumatic brain injury is associated with reduced long-term depression of excitatory postsynaptic potential in the rat hippocampal dentate gyrus. *Neural Regen Res.* 2018; 13(10): 1753–8.

Сведения об авторах:

Степанов Сергей Степанович, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета, e-mail: serg_stepanov@mail.ru;

Кошман Игорь Петрович, очный аспирант каф. неврологии и нейрохирургии Омского государственного медицинского университета, e-mail: koshman.ip@gmail.com;

Шоропова Анастасия Юрьевна, очный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета, e-mail: nastasya1994@mail.ru;

Калиничев Алексей Геннадьевич, доктор мед. наук, проф. каф. неврологии и нейрохирургии Омского государственного медицинского университета, e-mail: akalinichev59@gmail.com;

Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета;

Степанов Александр Сергеевич, канд. мед. наук, заочный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета, e-mail: stepan55@yandex.ru;

Авдеев Дмитрий Борисович, канд. ветеринарн. наук, ст. преподаватель каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета, e-mail: avdeev86@inbox.ru;

Маркелова Марина Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии Омского государственного медицинского университета, e-mail: marina.markelova@mail.ru