

# Морфофункциональная характеристика гиппокампа белых крыс в остром периоде после тяжелой черепно-мозговой травмы на фоне применения *L*-лизина эсцината

И.П. Кошман<sup>1</sup>, А.Ю. Шоронова<sup>1</sup>, С.С. Степанов<sup>1</sup>, А.Г. Калиничев<sup>1</sup>, В.А. Акулинин<sup>1</sup>, А.С. Степанов<sup>2</sup>, Д.Б. Авдеев<sup>1\*</sup>, В.Л. Молчанова<sup>2</sup>

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ

Российская Федерация, 644099, Омск, ул. Ленина, д. 12

<sup>2</sup> БУЗОО «Клинический онкологический диспансер»

Российская Федерация, 644013, Омск, ул. Завертяева, 9/1

\* Контактная информация: Авдеев Дмитрий Борисович, кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОГМУ. Email: avdeev86@inbox.ru

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование посвящено изучению влияния *L*-лизина эсцината на нервную ткань полей CA1 и CA3 гиппокампа головного мозга белых крыс (*Wistar*) в остром периоде после тяжелой черепно-мозговой травмы (ТЧМТ).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

ТЧМТ моделировали нанесением на теменно-затылочную область удара свободно падающим грузом массой 200–250 г с высоты 50 см с помощью специальной рельсовой стойки. Задачами исследования были: 1) сравнительная морфометрическая оценка степени гидратации, цито- и глиоархитектоники различных слоев полей CA1 и CA3 после ТЧМТ без лечения; 2) влияние на эти показатели *L*-лизина эсцината. Использованы гистологические (окраска срезов гематоксилином-эозином и по Нисслю), иммуногистохимические (на *NSE*, *MAP-2* и *GFAP*) и морфометрические методы. На тонких (4 мкм) серийных фронтальных срезах гиппокампа изучены нейроны, астроциты, микрососуды и нейропил в контроле (интактные животные,  $n=5$ ) и через 1 и 3 суток после травмы без лечения ( $n=10$ , группа сравнения) и с лечением ( $n=10$ , основная группа). Численную плотность нейронов определяли с помощью окраски клеток по Нисслю и реакции на *NSE*. Цитоскелет нейронов изучали с помощью реакции на *MAP-2*, а астроглии – *GFAP*. На цветных растровых изображениях (окраска гематоксилином и эозином, объектив  $\times 100$ ) с помощью плагин-фильтра "Find Maxima" определяли зоны максимальной яркости (ЗМЯ), которые затем анализировали с помощью "Analyze Particles" из программы *ImageJ* 1.52s. ЗМЯ соответствовали участкам гиппокампа с высокой степенью гидратации нервной ткани – отек-набухание. Характер распределения, статистические гипотезы, построение графиков проверяли с помощью программ *Statistica* 8.0 и среды *R*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У контрольных животных во всех слоях полей CA1 и CA3 преобладали нормохромные нейроны без признаков изменения цитоскелета, отмечена низкая степень гидратации нервной ткани (относительная доля ЗМЯ 5–8%). Через 1 и 3 суток после ТЧМТ статистически значимо увеличивалось очаговое содержание дистрофически и некробиотически измененных нейронов (95% доверительный интервал: 52–78%), отмечались проявления реактивного глиоза, а доля ЗМЯ увеличивалась до 16%. Выявлены статистически значимые послейные различия между полями CA1 и CA3 гиппокампа. Применение *L*-лизина эсцината оказывало статистически значимое влияние на морфометрические показатели нервной ткани гиппокампа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В раннем периоде после ТЧМТ увеличивалась степень гидратации нервной ткани гиппокампа. Отмечена гетероморфность дистрофических и некробиотических изменений в разных слоях полей CA1 и CA3. *L*-лизин эсцинат статистически значимо влиял на эти изменения. В большей степени это характерно для поля CA3. Выявленные изменения рассматриваются не только как пато-, но и как саногенетические структурные механизмы защиты и реорганизации гиппокампа в посттравматическом периоде.

## ВЫВОДЫ

1. В остром периоде (1–3 суток) после тяжелой черепно-мозговой травмы увеличивалась степень гидратации всех компонентов нервной ткани гиппокампа. В группе без лечения через 3 суток после травмы относительный объем зон отека-набухания варьировался от 10 до 13% в CA1 (контроль 3–7%) и от 8 до 16% – в CA3 (контроль 5–10%).
2. Установлена гетероморфность гидропических изменений в молекулярном слое, слое пирамидных нейронов и полиморфном слое. Максимальное увеличение объема свободной воды (более чем в 2 раза) было характерно для молекулярного и полиморфного слоя CA1, а также полиморфного слоя CA3.
3. Применение в остром периоде *L*-лизина эсцината способствовало статистически значимому изменению проявлений гидропической дистрофии. Через 1 сутки после травмы объем свободной воды увеличивался в сравнении с животными без лечения, а затем, спустя 3 суток, уменьшался, но оставался выше, чем в группе сравнения. Максимальное влияние препарата отмечено в поле CA3.

## Ключевые слова:

черепно-мозговая травма, гиппокамп, отек-набухание, иммуногистохимия, морфометрия, исследование *in vivo*, крысы *Wistar*, *L*-лизин эсцинат

<b>Ссылка для цитирования</b>	Кошман И.П., Шоронова А.Ю., Степанов С.С., Калинин А.Г., Акулинин В.А., Степанов А.С. и др. Морфофункциональная характеристика гиппокампа белых крыс в остром периоде после тяжелой черепно-мозговой травмы на фоне применения <i>L</i> -лизина эсцината. <i>Журнал им. Н.В. Склифосовского неотложная медицинская помощь</i> . 2020;9(4):528–537. <a href="https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-4-528-537">https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-4-528-537</a>
<b>Конфликт интересов</b>	Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов
<b>Благодарность, финансирование</b>	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. Данная работа выполнена при поддержке ФГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета в рамках подготовки и аттестации научно-педагогических и научных кадров

ЗМЯ — зоны максимальной яркости  
 МС — молекулярный слой  
 ПС — полиморфный слой  
 СПА — слой пирамидных нейронов  
 ТЧМТ — тяжелая черепно-мозговая травма  
 СА1, СА3 — поля гиппокампа  
 DAB — *Diaminobenzidine* — 3,3' диаминобензидин — хромоген для иммунохимического окрашивания иммуноблоттинга

*GFAP* — *Glial Fibrillary Acidic Protei* — глиальный фибриллярный кислый белок, биомаркер  
*MAP-2* — *Microtubuleassociated protein* — белок, ассоциированный с микротрубочками дендритного скелета  
*NSE* — *Neuron-specific enolase* — нейронспецифическая енолаза, онкомаркер нейроэндокринных опухолей

## ВВЕДЕНИЕ

Наиболее важной причиной развития неблагоприятных исходов в остром периоде после тяжелой черепно-мозговой травмы (ТЧМТ) является прогрессирующая внутричерепная гипертензия из-за развития выраженного посттравматического отека-набухания головного мозга [1], который приводит к вторичному нарушению микроциркуляции, ишемии и гибели нейронов [2–4]. То есть гидропические изменения традиционно рассматриваются как преимущественно отягчающие факторы посттравматического периода [5–7].

Согласно современным представлениям, наибольшее патогенетическое значение при развитии отека головного мозга имеет сосудистый компонент [8, 9–11]. В остром периоде травмы из-за повреждения гематоэнцефалического барьера и повышения его проницаемости развивается вазогенный отек, при этом в сером веществе головного мозга жидкость накапливается интрацеллюлярно, главным образом в нейроглии. Затем в связи с переходом жидкости из вне- во внутриклеточное пространство присоединяется цитотоксический отек [6, 12, 13].

Известно, что ТЧМТ оказывает влияние на все отделы структуры головного мозга по хорошо изученным законам первичного и вторичного повреждения в остром, подостром и отдаленном периодах [11, 14–16]. В этой связи особое значение имеет изучение последствий закрытой ТЧМТ на гиппокамп, который не имеет непосредственного контакта с травмирующим агентом, но оказывает существенное влияние на когнитивные функции и память [2, 4].

Существуют различные способы регуляции водного обмена, а, соответственно, объема свободной жидкости и внутричерепного давления [8, 17]. Лекарственный препарат *L*-лизина эсцинат способствует нормализации функции гематоэнцефалического барьера, оказывает антиэкссудативное, противовоспалительное действие [7, 8, 18]. Однако с помощью гистологических и морфометрических методов влияние *L*-лизина эсцината на нервную ткань гиппокампа белых крыс в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы не изучено.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрено этическим комитетом университета (протокол № 107 от 2 октября 2018 года). В качестве экспериментальных животных использовали 25 аутобредных половозрелых (возраст 110–120 суток) самцов крыс стока *Wistar* массой 270–350 грамм (ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»). 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 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 гистологического изучения гиппокампа головного мозга в остром посттравматическом периоде (1 и 3 суток) моделировали ТЧМТ,  $n=20$ . Для седации использовали раствор препарата *Zoletil 100* (5–7 единиц). Через 5 минут после введения *Zoletil 100* с помощью специальной рельсовой стойки на теменно-затылочную область наносили удар свободно падающим грузом массой 200–250 г с высоты 50 см.

После ТЧМТ все выжившие животные ( $n=20$ ) случайным образом (генератор чисел) были разделены на две группы. В основной группе ( $n=10$ ) сразу после нанесения травмы и в последующем один раз в сутки в боковую вену хвоста крысы инсулиновым шприцем вводили раствор системного ангиопротектора (*L*-лизина эсцинат) в разведении 0,1 мл препарата в 0,2 мл 0,9% раствора хлористого натрия (в соответствии со средней массой крысы). Животным группы сравнения ( $n=10$ ) препарат не вводили. Контролем служили интактные крысы ( $n=5$ ).

Вывод животных основной группы и группы сравнения из эксперимента осуществляли под наркозом (*Zoletil 100*) через 1 ( $n=5$ ) и 3 ( $n=5$ ) суток после травмы путем кровопускания. Мозг фиксировали перфузи-

ей: последовательно вводили 100–125 мл раствора 0,9% хлористого натрия и Фрагмина (5 000 единиц) и 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,2–7,4). После декапитации извлекали мозг, который хранили при температуре 3–5°C в аналогичном фиксаторе. Для приготовления препаратов материал заключали в гомогенизированный парафин (*HISTOMIX*®) с помощью автомата «STP 120». На самом микротоме *HM 450 (Thermo)* готовили серийные фронтальные срезы толщиной 4 мкм, которые выполняли на уровне гиппокампа в интервале от (-) 2,40 до (-) 3,36 мм от *Bregma* (антропометрическая точка, находящаяся на крыше черепа, темя) [19].

Для гистологического исследования срезы гиппокампа окрашивали по Нисслю, гематоксилином и эозином. Астроциты верифицировали с помощью иммуногистохимической реакции на глиальный фибриллярный кислый белок (*GFAP*), а нейроны — с помощью ассоциированного с микротрубочками белка (*MAP-2*) и нейронспецифической енолазы (*NSE*). Срезы помещали на полилизиновые стекла. В качестве первичных использовали моноклональные мышиные (*Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания*) и поликлональные антитела (*NSE*). Для визуализации *GFAP* астроцитов и *MAP-2* нейронов использовали мультимерный набор *Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания)*. Для *NSE* применяли поликлональные антитела (источник — кролик) к крысиному антигену (*Cloud-Clone Corp.*). После реакции с первичными антителами срезы последовательно инкубировали со вторичными антителами, затем хромогеном *DAB (3,3'-диаминобензидин)*, докрашивали гематоксилином и заключали в полистирол.

Препараты фотографировали на микроскопе *Leica DM 1000* (объектив x100, камера *GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4x1,4 μm*), изображение сохраняли в файлах с расширением *tiff (2592x1944 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*. Для выявления зон отека-набухания (максимальная яркость пикселей — *Maxima*) нервной ткани использовали плагин-фильтр "*Find Maxima*" *M. Schmid* из программы *ImageJ 1.52s* (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). На каждый срок использовали по 50 случайно выбранных полей зрения (область интереса) цветных изображений площадью 19600 мкм<sup>2</sup>. На полученных в результате работы этого фильтра масках изображений определяли ("*Analyze Particles*") относительную площадь зон максимальной яркости (ЗМА), которые затем переводили в объем (*V\_maxima*, мкм<sup>3</sup>). Неравномерность распределения ЗМА оценивали с помощью алгоритма водораздела "*Segmented Particles*", примененного к значениям яркости изображения, использовали режим "*Maxima Within Tolerance*", а для отсекаания пустых крупных сосудов подбирали значение "*Prominence*" (10–11).

Чтобы избежать систематических ошибок при проверке статистических гипотез с помощью генератора случайных чисел в программе *Statistica 8.0* из полученных массивов данных проводили процедуру рандомизации полей зрения (отбирали *n=50* на каждый

срок). Характер распределения вариационных рядов оценивали с помощью тестов *Shapiro–Wilk (Statistica 8.0)*. Проверку статистических гипотез осуществляли с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни (*Mann–Whitney U-test*) и ANOVA (однофакторный дисперсионный анализ) *Краскела–Уоллиса (StatSoft Statistica 8.0)*. Количественные данные в работе представлены как медиана (50% квартиль — мера центральной тенденции), 25–75% квартили и диапазоны без выбросов (*Max–Min*) — меры разброса изученных величин. Медиана является робастной характеристикой и наиболее подходит для подобного типа исследований [20]. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при *p<0,05*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В норме (группа контроля) на срезах гиппокампа, окрашенных гематоксилином-эозином и тионином, в CA1 и CA3 преобладали типичные нормохромные пирамидные нейроны с крупным ядром, признаков гидропической и белковой дистрофии не выявлялось. Нейропилль представляется однородным субстратом без структурных проявлений отека-набухания его составляющих (дендриты, синапсы, отростки астроцитов) (рис. 1 А, С). С помощью иммуногистохимических реакций четко верифицировались нейроны (*NSE*) и глиальные клетки (*GFAP*) (рис. 2 А, В, С).

После ТЧМТ появлялись типичные структурные признаки гидропической и белковой дистрофии: вакуолизованные, гипохромные и гиперхромные нейроны без и с наличием сморщивания (пикноморфные), отек-набухание нейронов, дендритов, нейропиля, отек перичеселлярных и периваскулярных отростков астроцитов и олигоглиоцитов (рис. 1 В, D; 2 D–G). Кроме гидропических изменений отмечались признаки реактивного нейроглиоза: увеличивалась плотность глиоцитов и их отростков (рис. 2 В, С, Е, G). Изменения носили очаговый характер: участки CA1 и CA3 с полным преобладанием нормохромных нейронов сочетались с участками повреждения, в которых 52–78% (95%

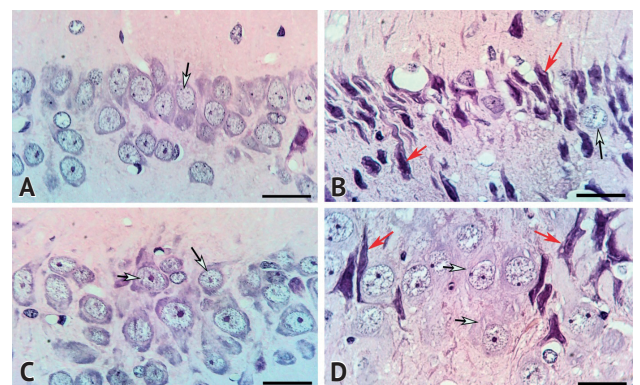


Рис. 1. CA1 (А, В) и CA3 (С, D) гиппокампа головного мозга в норме (А, С) и через 3 суток (В, D) после тяжелой черепно-мозговой травмы: в норме преобладают нормохромные пирамидные нейроны (белые стрелки); после травмы появлялись пикноморфные нейроны (красные стрелки) и проявления отека-набухания. Окраска гематоксилином и эозином; объектив x100; шкала — 25 мкм

Fig. 1. CA1 (A, B) and CA3 (C, D) of the hippocampus of the brain in norm (A, C) and 3 days (B, D) after severe traumatic brain injury: normochromic pyramidal neurons (white arrows) prevail in norm); after injury, picnomorphic neurons (red arrows) and manifestations of edema-swelling appeared. Hematoxylin-eosin staining; x100; scale — 25 microns

доверительный интервал) нейронов имели признаки обратимой или необратимой дистрофии. Преобладали гиперхромные изменения. В необратимо измененных пикноморфных нейронах происходила конденсация и гомогенизация хроматофильного вещества ядра и цитоплазмы, «исчезновение» ядрышка. Максимальное количество таких нейронов встречалось через 3 суток после травмы (в некоторых очагах до 80%) (рис. 1 В). Существенно то, что перичеселлюлярный отек был отмечен не вокруг всех поврежденных нейронов. Это свидетельствовало об отсутствии функциональной связи между этими качественными переменными (рис. 1 В, D; 2 E–G).

Таким образом, по данным обзорного гистологического исследования, после ТЧМТ в гиппокампе увеличивалась степень гидратации перикариона нейронов и нейропиля, происходило образование и перераспределение свободной воды между внутриклеточными (ядро и цитоплазма, цитоскелет), клеточными (нейроны, глия, нейропилль) и межклеточными компартментами нервной ткани. То есть в процессе перераспределения воды участвовали все ее структурные компоненты (рис. 2 D–F; 3 B, D).

Морфометрическая оценка изменения содержания свободной воды проводилась по количеству и площади зон ярких пикселей (ЗМЯ — максимальная гидратация

и свободная вода) на цветных изображениях, выявленных с помощью плагин-фильтра “Find Maxima” в программе ImageJ1.52 (рис. 4 A–D).

На растровых изображениях нервной ткани (при окраске гематоксилином и эозином) степень гидратации ее компонентов определялась яркостью пикселей (от 0 до 255). Максимального значения (230–245) достигали участки, содержащие свободную воду, тогда как в других участках степень гидратации (химическая связь) нейропиля по яркости пикселей имела диапазон от 190 до 230. В контроле ЗМЯ соответствовали в основном просветам сосудов, редко встречались в периваскулярных пространствах и нейропиле. После травмы количество ЗМЯ даже визуально было больше, чем в норме. ЗМЯ имели сложную форму и неправильные очертания (рис. 4 A, B).

Таким образом, для контроля характерна низкая степень гидратации (способность воды к химической ассоциации с гидрофильными веществами — набухание) нервной ткани и практически полное отсутствие в ней свободной воды (механическая форма связи с окружающими структурами — отек).

В контроле объем всех ЗМЯ (на 1 мм<sup>3</sup>) в гиппокампе не превышал 5–8%. При этом в поле CA1 абсолютное значение этого показателя — 0,054 (0,047–0,062) мм<sup>3</sup> — было статистически значимо меньше, чем в поле

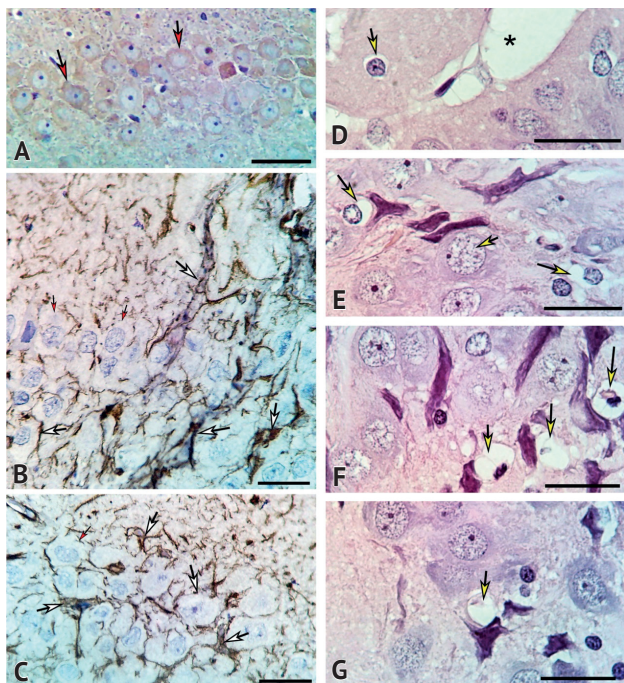


Рис. 2. Произвольно взятые поля зрения (A, B, D — CA1, C, E, F, G — CA3) гиппокампа головного мозга в норме (A) и через 1 (D) и 3 сут (B, C, E, F, G) после черепно-мозговой травмы: A — распределение NSE-позитивных перикарионов (красные стрелки), B, C — отростков астроцитов (белые стрелки); D–G — различные проявления и компартменты скопления свободной воды (желтые стрелки). Иммуногистохимическая реакция на NSE (A), GFAP (B, C); окраска гематоксилином и эозином (D–G). Объектив x40 (A), x100 (B–G); шкала — 25 мкм

Fig. 2. Arbitrarily taken visual fields (A, B, D - CA1, C, E, F, G - CA3) of the hippocampus of the brain in norm (A) and 1 (d) and 3 days (B, C, E, F, G) after traumatic brain injury: A — distribution of NSE-positive perikaryons (red arrows), B, C — astrocyte processes (white arrows); D–G — various manifestations and compartments of free water accumulation (yellow arrows). Immunohistochemical reaction for NSE (A), GFAP (B, C); staining with hematoxylin and eosin (D–G). Magn x40 (A), x100 (B–G); scale — 25 microns

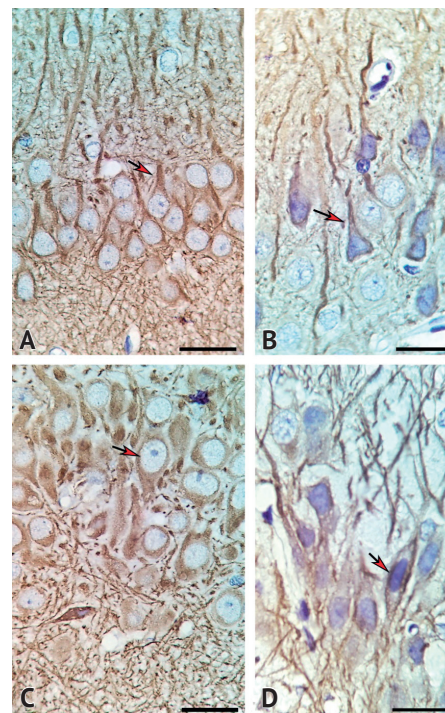


Рис. 3. Произвольно взятые поля зрения (A, B — CA1, C, D — CA3) гиппокампа головного мозга белой крысы в норме (A, C), через 1 (B) и 3 сут (D) после тяжелой черепно-мозговой травмы: MAP-2-позитивные перикарионы и отростки нейронов после травмы подвергались констрикции, скапливались по периферии перикариона, принимали штопорообразную форму, отмечался межклеточный отек, особенно наглядно это видно в поле CA3. Иммуногистохимическая реакция на MAP-2; объектив x100; шкала — 25 мкм

Fig. 3. Arbitrarily taken visual fields (A, B — CA1, C, D — CA3) of the hippocampus of the brain of a white rat in normal conditions (A, C), after 1 (B) and 3 days (D) after severe traumatic brain injury: MAP-2-positive perikarya and neuronal processes after injury underwent constriction, accumulated along the periphery of the perikarya, took a corkscrew shape, intercellular edema was noted, this is especially clearly seen in field CA3. Immunohistochemical reaction for MAP-2; x100; scale — 25 microns

CA3 — 0,072 (0,065–0,079) мм<sup>3</sup> ( $p < 0,01$ ) (рис. 5). Это связано с тем, что в *stratum lucidum* — блестящем слое эпидермиса CA3 содержится большое количество апоикальных дендритов пирамидных нейронов и гигантских синаптических терминалей, сформированных аксонами мшистых волокон на телах и дендритах нейронов. Поэтому эта зона на изображении оказалась более светлой и содержала большее количество ярких пикселей (рис. 3 С).

Крупные ЗМЯ, соответствующие просветам артериол и венул, нами не учитывались.

В остром посттравматическом периоде в обеих экспериментальных группах объем ЗМЯ статистически значимо превосходил контрольное значение и в полях CA1 и CA3 примерно в 2 раза, а также различался между экспериментальными группами по времени после травмы. Максимальное увеличение всего объема ЗМЯ в гиппокампе выявили через 3 сут после травмы. В нейропиле размеры одной ЗМЯ соответствовали размерам срезов дендритов, астроцитарных отростков и крупных синапсов — 0,4–3,5 мкм. Более крупные ЗМЯ (перичеселлюлярный и периваскулярный отек), как правило, были представлены совокупностью конгломератов соответствующих астроцитарных отростков и их телами (рис. 3 D–G). После травмы частотный

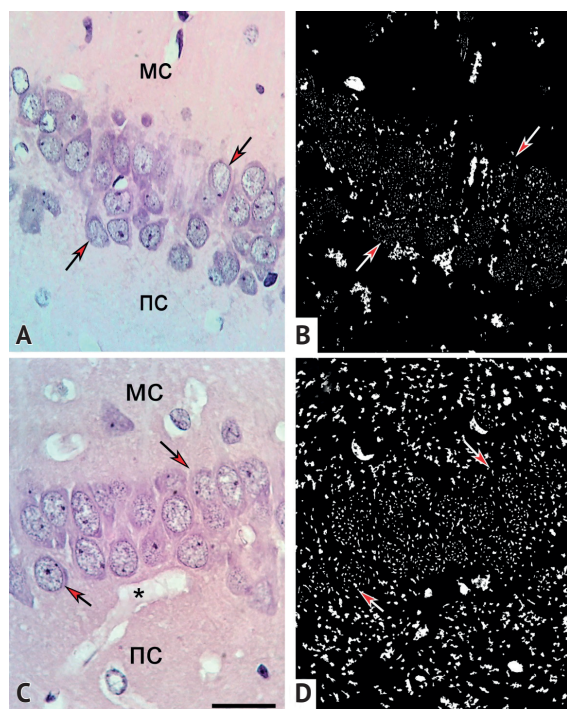


Рис. 4. CA1 гиппокампа (A, B — контроль; 1 С, D — 1 сут после травмы): технология морфометрического измерения зон максимальной яркости изображения: А, С — стандартная случайно выделенная область интереса; В, D — результат применения фильтра “Find Maxima” и плагина “Analyze Particles”. Зоны максимальной яркости имеют сложную форму, после травмы количество зон визуально больше, чем в норме. Стрелки — слой пирамидных нейронов, МС — молекулярный слой, ПС — полиморфный. Окраска гематоксилином и эозином; объектив x100; шкала — 25 мкм  
Fig. 4. CA1 hippocampus (A, B - control; 1 C, D — 1 day after injury): technology of morphometric measurement of areas of maximum image brightness: A, C - standard randomly selected area of interest; B, D — the result of applying the “Find Maxima” filter and the “Analyze Particles” plugin. The zones of maximum brightness have a complex shape; after an injury, the number of zones is visually greater than normal. Arrows — layer of pyramidal neurons, МС — molecular layer, ПС — polymorphic. Hematoxylin-eosin staining; magn x100; scale — 25 microns

спектр смещался в сторону увеличения содержания более крупных ЗМЯ, что было особенно характерно для CA1 (рис. 5).

Использование препарата L-лизина эсцината приводило к частичному уменьшению общего объема отечных компартментов (ЗМЯ) только через 3 суток после травмы. Особенно наглядно это было видно в CA3 (рис. 5). Вероятно, последнее свидетельствовало о влиянии препарата на степень гидратации нервной ткани гиппокампа. В этот период также происходило максимальное накопление пикноморфных нейронов (рис. 3 E–G).

Нами установлена гетероморфность гидропических изменений в молекулярном слое, слое пирамидных нейронов и полиморфном слое гиппокампа (рис. 6 и 7). Максимальное увеличение объема свободной воды было характерно для молекулярного и полиморфного слоев поля CA1 и полиморфного слоя CA3, где этот показатель в посттравматическом периоде увеличивался более чем в 2 раза.

После использования L-лизина эсцината объем ЗМЯ был статистически значимо выше, чем в группе сравнения без препарата. Однако при парном сравнении по срокам внутри основной группы объем свободной жидкости через 3 суток снижался во всех слоях поля CA3 и полиморфном слое поля CA1. В группе сравнения подобного не происходило (рис. 6). Это свидетельствовало о влиянии препарата на перераспределение жидкости внутри компартментов нервной ткани.

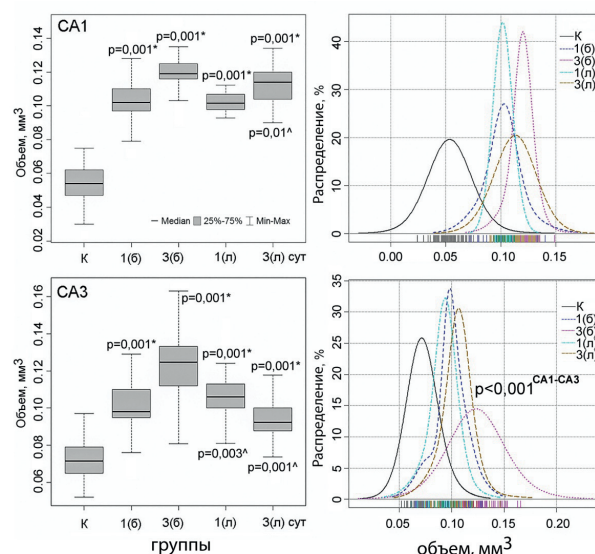


Рис. 5. Морфометрическая характеристика изменения степени гидратации нервной ткани полей CA1 и CA3 гиппокампа в остром посттравматическом периоде (1-е и 3-и сутки) в группах без (б) и с лечением (л): распределение полей зрения по объему зон максимальной яркости в 1 мм<sup>3</sup>; \* — различия в сравнении с контролем и (\*) между экспериментальными группами статистически значимы ( $p < 0,001$ , критерий Манна–Уитни). Материал представлен как медиана (50%), 25–75% квартили и диапазон без выбросов (Min–Max)

Fig. 5. Morphometric characteristics of changes in the degree of hydration of the nervous tissue of the CA1 and CA3 hippocampus in the acute post-traumatic period (1st and 3rd days) in groups without and with treatment: distribution of visual fields by the volume of zones of maximum brightness in 1 mm<sup>3</sup>; \* — differences in comparison with control and (\*) between experimental groups are statistically significant ( $p < 0.001$ , Mann–Whitney test). Material presented as median (50%), 25–75% quartile and no outlier range (Min–Max)

Однако в молекулярном слое и слое пирамидных нейронов CA1 объем ЗМЯ оставался на уровне предыдущего срока (рис. 6). Следовательно, при использовании L-лизина эсцината степень гидратации нервной ткани разных слоев полей CA1 и CA3 гиппокампа изменялась неоднозначно. Вполне вероятно, что это зависело от каких-то особенностей организации их нейроглиосудистых микроструктурных комплексов.

О выраженном различии изменения объема свободной жидкости по слоям полей CA1 и CA3 гиппокампа свидетельствовали и частотные характеристики

распределения размеров ЗМЯ (рис. 7). Таким образом, в гиппокампе нами выявлена гетероморфность гидротических изменений как ответной реакции на ТЧМТ.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Результаты настоящего экспериментального морфологического исследования свидетельствуют о том, что в остром периоде после ТЧМТ в полях CA1 и CA3 гиппокампа увеличивается степень гидратации нервной ткани (набухание), при котором часть химически связанной с макромолекулами воды переходит

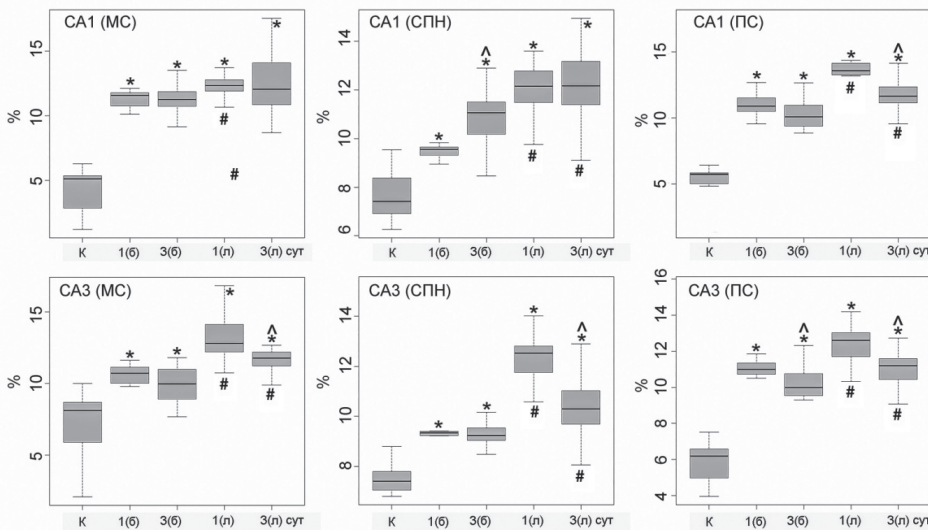


Рис. 6. Процентная доля зон максимальной яркости в 1 мм<sup>3</sup> нервной ткани разных слоев полей CA1 и CA3 гиппокампа в контроле и остром посттравматическом периоде (1-е и 3-и сутки) в группах без (б) и с лечением (л). Различия в сравнении с контролем (\*), между сроками (^) и экспериментальными группами (#) статистически значимы (p<0,001, критерий Манна–Уитни). Материал представлен как медиана (50%), 25–75% квартили и диапазон без выбросов (Min–Max). MC – молекулярный слой; СПН – слой пирамидных нейронов; ПС – полиморфный слой

Fig. 6. Percentage of zones of maximum brightness in 1 mm<sup>3</sup> of nervous tissue of different layers of fields CA1 and CA3 of the hippocampus in the control and acute post-traumatic period (1st and 3rd days) in groups without and with treatment. Differences in comparison with the control (\*), between the terms (^) and experimental groups (#) are statistically significant (p<0.001, Mann–Whitney test). Material is presented as median (50%), 25–75% quartile, and no outlier range (Min–Max). MC – molecular layer; СПН – layer of pyramidal neurons; ПС – polymorphic layer

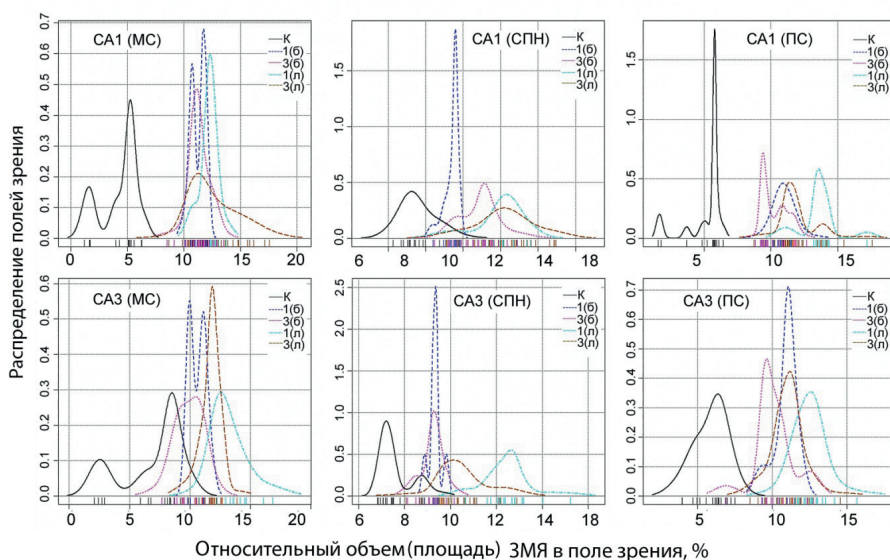


Рис. 7. Частотное распределение полей зрения по относительному объему (площади) зон максимальной яркости в молекулярном слое (МС), слое пирамидных нейронов (СПН) и полиморфном слое (ПС) полей CA1 и CA3 гиппокампа в контроле и остром посттравматическом периоде (1-е и 3-и сутки) в группах без (б) и с лечением (л)

Fig. 7. Frequency distribution of visual fields by the relative volume (area) of the zones of maximum brightness in the molecular layer (ML), the layer of pyramidal neurons (PNL) and polymorphic layer (PL) of the CA1 and CA3 fields of the hippocampus in control and acute post-traumatic period (1st and 3rd day) in groups without and with treatment

в состояние свободной формы и перераспределяется между нервными и глиальными клетками (мелкоочаговый отек). Мы полагаем, что существует два основных направления потоков свободной воды из нейронов в глиоциты: 1) на уровне отростков (в нейропиле) и 2) из тел нейронов (клеточные слои) в перичеселлюлярное пространство. При этом в одних случаях выход воды из нейронов осуществляется только из отростков, а в других задействованы оба направления. В пользу этого свидетельствует выявление в одном поле зрения гиппокампа гиперхромных нейронов с крайней степенью дегидратации (пикноморфные клетки) без каких-либо признаков перичеселлюлярного отека и с выраженным перичеселлюлярным отеком. Что является причиной подобных различий — пока не ясно. Найденные различия мы связываем с полной реализацией потенциала дренажно-детоксикационной системы отдельного нейрона или их группы (колонки) в каждом конкретном случае. Вполне вероятно, что это может каким-то образом влиять на исход ишемического повреждения нейронов.

Посттравматические изменения степени гидратации нервной ткани сопровождались изменениями тинкториальных свойств перикарионов, отростков нейронов, синаптических терминалей и астроцитов. Это позволило с помощью специального фильтра (*“Find Maxima”* из программы *ImageJ 1.52s*) на цветных изображениях оценить их количественно, выявить зоны максимальной гидратации нервной ткани и определить объем этих зон. Установлено, что в контроле объем свободной жидкости в гиппокампе не превышал 8–10% (*Max*), а в остром периоде (1-е и 3-и сутки) после ТЧМТ достигал 16%.

Использование *L*-лизина эсцината оказывало статистически значимое влияние на распределение воды в нервной ткани гиппокампа. Существенно то, что вначале, через 1 сутки после травмы, использование этого препарата сопровождалось увеличением объема свободной воды, тогда как только через 3 суток значение этого показателя снижалось. Для группы сравнения это не характерно. Наиболее эффективно *L*-лизина эсцинат влиял на водный баланс в зоне поля СА3. Вероятно, прежде всего он способствовал удалению воды и растворенных в ней ишемических токсинов из нейронов, а затем из астроцитов в кровеносные сосуды. Это накладывалось на естественные механизмы санации нервной ткани, которые осуществляются с помощью различных дренажных систем нейроглиососудистых микроструктурных комплексов [21, 22]. Однако патобиохимические процессы гидропической обратимой и необратимой дистрофии нейронов подавлялись лишь частично и развивались в обеих изученных группах в одинаковом направлении: набухание → отек → резорбция свободной воды из тела и отростков нейронов в компартмент нейроглиальных клеток (преимущественно плазматических астроцитов

и олигодендроглиоцитов) → перенос в периваскулярное пространство → резорбция из глиальных клеток в сосуды. Все это происходило в остром периоде на фоне повреждения нейронов, дисфункции гематоэнцефалического барьера и, несмотря на лечение, полностью не завершалось. Подобные трансформации характерны для реактивно измененных астроцитов и описаны другими авторами [23, 24]. При использовании *L*-лизина эсцината, скорее всего, усиливался отток воды через сосуды и уменьшался перичеселлюлярный отек. Вполне вероятно, что именно высокая активность дренажно-детоксикационной функции в поле СА3 в норме и ее адаптационная и компенсаторная стимуляция при использовании препарата могли быть причиной разной чувствительности к ишемии нейронов полей СА1 и СА3, описанной ранее в других работах [25]. В этой связи найденное нами сочетание активации дренажно-детоксикационной функции и сохранения высокой степени гидратации нейронов и отростков астроцитов в нейропиле можно рассматривать как новый неизученный механизм саногенеза после травмы. Вероятно, в поле СА3 происходит более полное удаление «ишемических токсинов», чем в поле СА1 гиппокампа. Полученные данные можно использовать при исследовании феномена селективного повреждения нейронов гиппокампа и роли механизмов отека-набухания в санации патологически измененной нервной ткани. Для оценки активности препарата *L*-лизина эсцината как нейропротектора необходимо проведение дальнейших экспериментальных исследований, касающихся более поздних сроков посттравматического периода в рамках предложенного направления.

## ВЫВОДЫ

1. В остром периоде (1–3 суток) после тяжелой черепно-мозговой травмы увеличивалась степень гидратации всех компонентов нервной ткани гиппокампа. В группе без лечения через 3 суток после травмы относительный объем зон отека-набухания варьировался от 10 до 13% в СА1 (контроль — 3–7%) и от 8 до 16% в СА3 (контроль — 5–10%).

2. Установлена гетероморфность гидропических изменений в молекулярном слое, слое пирамидных нейронов и полиморфном слое. Максимальное увеличение объема свободной воды (более чем в 2 раза) было характерно для молекулярного и полиморфного слоя СА1, а также полиморфного слоя СА3.

3. Применение в остром периоде *L*-лизина эсцината способствовало статистически значимому изменению проявлений гидропической дистрофии. Через 1 сутки после травмы объем свободной воды увеличивался в сравнении с животными без лечения, а затем, спустя 3 суток, уменьшался, но оставался выше, чем в группе сравнения. Максимальное влияние препарата отмечено в поле СА3.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Задворнов А.А., Голомидов А.В., Григорьев Е.В. Клиническая патофизиология отека головного мозга (часть 2). *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2017;14(4):52–60. <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2017-14-4-52-60>
2. Spitz G, Bigler ED, Abildskov T, Maller JJ, O’Sullivan R, Ponsford JL. Regional cortical volume and cognitive functioning following traumatic brain injury. *Brain Cogn*. 2013;83(1):34–44. PMID: 23872098 <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2013.06.007>
3. Palacios EM, Sala-Llonch R, Junque C, Fernandez-Espejo D, Roig T, Tormos JM, et al. Long-term declarative memory deficits in diffuse TBI: correlations with cortical thickness, white matter integrity and hippocampal volume. *Cortex*. 2013;49(3):646–657. PMID: 22482692 <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2012.02.011>
4. Salmond CH, Chatfield DA, Menon DK, Pickard JD, Sahakian BJ. Cognitive sequelae of head injury: involvement of basal forebrain and associated structures. *Brain*. 2005;128(Pt 1):189–200. PMID: 15548553 <https://doi.org/10.1093/brain/awh352>
5. Крылов В.В., Петриков С.С., Солодов А.А. Внутрочерепная гипертензия. Москва: БИНОМ; 2016.
6. Латышева В.Я., Курман В.И., Цуканов А.Н., Усова Н.Н., Галиновская Н.В., Олизарович М.В. Отек головного мозга: этиопатогенез,

- клиника, диагностика, лечение: практическое пособие для врачей. Гомель; 2016.
- Петриков С.С., Солодов А.А., Бадыгов С.А., Мехиа Мехиа Э.Д., Крылов В.В. Влияние L-лизина асцината на внутричерепное давление у пострадавших с тяжелой черепно-мозговой травмой, находящихся в критическом состоянии. *Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь*. 2016;2:31–36.
  - Мирзабаев М.Ж., Дюсембеков Е.К., Алиев М.А. Динамика и пути коррекции внутричерепного давления у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой. *Вестник алматинского государственного института усовершенствования врачей*. 2017;3:42–27.
  - Schwarzmaier SM, Gallozzi M, Plesnila N. Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice. *J Neurotrauma*. 2015;32(13):990–1000. PMID: 25585052. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3775>
  - Alves JL. Blood-brain barrier and traumatic brain injury. *J Neurosci Res*. 2014;92(2):141–147. PMID: 24327344. <https://doi.org/10.1002/jnr.23300>
  - van den Bedem H, Kuhl E. Molecular mechanisms of chronic traumatic encephalopathy. *Curr Opin Biomed Eng*. 2017;1:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.02.005>
  - Задворнов А.А., Голомидов А.В., Григорьев Е.В. Клиническая патофизиология отека головного мозга (часть 1). *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2017;14(3):44–50. <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2017-14-3-44-50>
  - Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(3):513–538. PMID: 26661240 <https://doi.org/10.1177/0271678X15617172>
  - Böhmer AE, Oses JP, Schmidt AP, Perón CS, Krebs CL, Oppitz PP, et al. Neuron-specific enolase, S100B, and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2011;68(6):1624–1630. PMID: 21368691 <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e318214a81f>
  - Harris TC, de Rooij R, Kuhl E. The Shrinking Brain: Cerebral Atrophy Following Traumatic Brain Injury. *Ann Biomed Eng*. 2019;47(9):1941–1959. PMID: 30341741 <https://doi.org/10.1007/s10439-018-02148-2>
  - Cole JH, Jolly A, de Simoni S, Bourke N, Patel MC, Scott G, et al. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury. *Brain*. 2018;141(5):822–836. PMID: 29309542 <https://doi.org/10.1093/brain/awx354>
  - Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:528. PMID: 31827423 <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00528>
  - Парфенов В.А. Использование L-лизина асцината при заболеваниях центральной нервной системы. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2011;3(4):99–104.
  - Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
  - Боровиков В. *Статистика. Искусство анализа данных на компьютере*. 2-е изд. Санкт-Петербург: Питер; 2003.
  - Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Клеточные системы восстановления и утилизации поврежденных нейронов головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2017;103(10):1135–1147.
  - Степанов А.С., Акулинин В.А., Мыщик А.В., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии. *Общая реаниматология*. 2017;13(6):6–17. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2017-6-6-17>
  - Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett*. 2014;565:23–29. PMID: 24361547 <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
  - Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014;94(4):1077–1098. PMID: 25287860 <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013>
  - Schmidt-Kastner R, Aguirre-Chen C, Saul I, Yick L, Hamasaki D, Busto R, et al. Astrocytes react to oligemia in the forebrain induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res*. 2005;1052(1):28–39. PMID: 16023090 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.06.018>

## REFERENCES

- Zadvornov AA, Golomidov AV, Grigoriev EV. Clinical Pathophysiology of Cerebral Edema (Part 2). *Messenger of Anesthesiology and Resuscitation*. 2017;14(4):52–60. (In Russ.) <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2017-14-4-52-60>
- Spitz G, Bigler ED, Abildskov T, Maller JJ, O'Sullivan R, Ponsford JL. Regional cortical volume and cognitive functioning following traumatic brain injury. *Brain Cogn*. 2013; 83(1):34–44. PMID: 23872098 <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2013.06.007>
- Palacios EM, Sala-Llonch R, Junque C, Fernandez-Espejo D, Roig T, Tormos JM, et al. Long-term declarative memory deficits in diffuse TBI: correlations with cortical thickness, white matter integrity and hippocampal volume. *Cortex*. 2013; 49(5):646–657. PMID: 22482692 <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2012.02.011>
- Salmond CH, Chatfield DA, Menon DK, Pickard JD, Sahakian BJ. Cognitive sequelae of head injury: involvement of basal forebrain and associated structures. *Brain*. 2005;128(Pt 1):189–200. PMID: 15548553 <https://doi.org/10.1093/brain/awh352>
- Krylov VV, Petrikov SS, Solodov AA. *Vnutricherepnaya gipertenziya*. Moscow: BINOM Publ.; 2016. (In Russ.)
- Latysheva VYa, Kurman VI, Tsukanov AN, Usova NN, Galinovskaya NV, Olizarovich MV. *Otek golovnogo mozga: etiopatogenez, klinika, diagnostika, lechenie*. Gomel Publ.; 2016. (In Russ.)
- Petrikov SS, Solodov AA, Badygov SA, Mekhia Mekhia ED, Krylov VV. Effects of L-Lysine Aescinat on Intracranial Pressure in Critically Ill Patients With Severe Traumatic Brain Injury. *Russian Sklifosovsky Journal Emergency Medical Care*. 2016;(2):31–36. (In Russ.)
- Mirzabayev MZh, Dnsembekov EK, Aliev MA. Dynamics and Correction Ways of Intracranial Pressure in Patients With Heavy Brain Injury. *Herald of Almaty State Institute of Advanced Medical Education*. 2017;3:42–27. (In Russ.)
- Schwarzmaier SM, Gallozzi M, Plesnila N. Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice. *J Neurotrauma*. 2015;32(13):990–1000. PMID: 25585052. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3775>
- Alves JL. Blood-brain barrier and traumatic brain injury. *J Neurosci Res*. 2014;92(2):141–147. PMID: 24327344. <https://doi.org/10.1002/jnr.23300>
- van den Bedem H, Kuhl E. Molecular mechanisms of chronic traumatic encephalopathy. *Curr Opin Biomed Eng*. 2017;1:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.02.005>
- Zadvornov AA, Golomidov AV, Grigoriev EV. Clinical Pathophysiology of Cerebral Edema (Part 1). *Messenger of Anesthesiology and Resuscitation*. 2017;14(3):44–50. (In Russ.) <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2017-14-3-44-50>
- Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular Pathophysiology of Cerebral Edema. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(3):513–538. PMID: 26661240. <https://doi.org/10.1177/0271678X15617172>
- Böhmer AE, Oses JP, Schmidt AP, Perón CS, Krebs CL, Oppitz PP, et al. Neuron-specific enolase, S100B, and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2011;68(6):1624–1630. PMID: 21368691. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e318214a81f>
- Harris TC, de Rooij R, Kuhl E. The Shrinking Brain: Cerebral Atrophy Following Traumatic Brain Injury. *Ann Biomed Eng*. 2019;47(9):1941–1959. PMID: 30341741. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-02148-2>
- Cole JH, Jolly A, de Simoni S, Bourke N, Patel MC, Scott G, et al. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury. *Brain*. 2018;141(5):822–836. PMID: 29309542 <https://doi.org/10.1093/brain/awx354>
- Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:528. PMID: 31827423. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00528>
- Парфенов В.А. Use of L-lysine aescinate in central nervous system diseases. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2011;3(4):99–104. (In Russ.) <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2011-355>
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
- Borovikov V. *Статистика. Искусство анализа данных на компьютере*. 2nd ed. Saint Petersburg: Piter Publ.; 2003. (In Russ.)
- Stepanov AS, Akulinin VA, Stepanov SS, Avdeev DB. Cellular Systems for the Recovery and Recycling of Damaged Brain Neurons in White Rats After a 20-Minute Occlusion of Common Carotid Arteries. *Russian Journal of Physiology*. 2017;103(10):1135–1147. (In Russ.)
- Stepanov AS, Akulinin VA, Mysik AV, Stepanov SS, Avdeev DB. Neuro-Glio-Vascular Complexes of the Brain After Acute Ischemia. *General Reanimatology*. 2017;13(6):6–17. (In Russ.) <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2017-6-6-17>
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett*. 2014;565:23–29. PMID: 24361547. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014;94(4):1077–1098. PMID: 25287860. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013>
- Schmidt-Kastner R, Aguirre-Chen C, Saul I, Yick L, Hamasaki D, Busto R, et al. Astrocytes react to oligemia in the forebrain induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res*. 2005;1052(1):28–39. PMID: 16023090 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.06.018>



## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Кошман Игорь Петрович**

очный аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, ФГБОУ ВО ОГМУ;  
<https://orcid.org/0000-0002-9763-2981>, [koshman.ip@gmail.com](mailto:koshman.ip@gmail.com);  
 20%: выполнение экспериментального, анатомического, гистологического, иммуногистохимического, морфометрического и информационно-математического методов исследования, а также методов наблюдения, описания и анализа

**Шоронова Анастасия Юрьевна**

ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОГМУ;  
<https://orcid.org/0000-0002-0936-3137>, [nastasya1994@mail.ru](mailto:nastasya1994@mail.ru);  
 20%: выполнение экспериментального, анатомического, гистологического, иммуногистохимического, морфометрического и информационно-математического методов исследования, а также методов наблюдения, описания и анализа

**Степанов Сергей Степанович**

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОГМУ;  
<https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>, [serg\\_stepanov@mail.ru](mailto:serg_stepanov@mail.ru);  
 20%: выполнение экспериментального, анатомического, гистологического, иммуногистохимического, морфометрического и информационно-математического методов исследования, а также методов наблюдения, описания и анализа

**Калиничев Алексей Геннадьевич**

доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии, ФГБОУ ВО ОГМУ;  
<https://orcid.org/0000-0002-2534-6329>, [akalinichev59@gmail.com](mailto:akalinichev59@gmail.com);  
 10%: выполнение экспериментального, анатомического, гистологического, иммуногистохимического, морфометрического и информационно-математического методов исследования, а также методов наблюдения, описания и анализа

**Акулинин Виктор Александрович**

доктор медицинских наук, профессор, зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОГМУ;  
<https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>, [akulinin@omsk-osma.ru](mailto:akulinin@omsk-osma.ru);  
 10%: выполнение экспериментального, анатомического, гистологического, иммуногистохимического, морфометрического и информационно-математического методов исследования, а также методов наблюдения, описания и анализа

**Степанов Александр Сергеевич**

кандидат медицинских наук, онколог высшей категории хирургического отделения № 2 БУЗОО «Клинический онкологический диспансер»;  
<https://orcid.org/0000-0002-8392-9514>, [stepan55@yandex.ru](mailto:stepan55@yandex.ru);  
 10%: выполнение экспериментального, анатомического, гистологического, иммуногистохимического, морфометрического и информационно-математического методов исследования, а также методов наблюдения, описания и анализа

**Авдеев Дмитрий Борисович**

кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОГМУ;  
<https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>, [avdeev86@inbox.ru](mailto:avdeev86@inbox.ru);  
 5%: выполнение экспериментального, анатомического, гистологического, иммуногистохимического, морфометрического и информационно-математического методов исследования, а также методов наблюдения, описания и анализа

**Молчанова Валентина Львовна**

фельдшер-лаборант патологоанатомического отделения БУЗОО «Клинический онкологический диспансер»;  
[molchanova.v.l@mail.ru](mailto:molchanova.v.l@mail.ru);  
 5%: выполнение экспериментального, анатомического, гистологического, иммуногистохимического, морфометрического и информационно-математического методов исследования, а также методов наблюдения, описания и анализа

Received on 05.05.2020

Review completed on 29.06.2020

Accepted on 29.09.2020

Поступила в редакцию 05.05.2020

Рецензирование завершено 29.06.2020

Принята к печати 29.09.2020

## Morphofunctional Characteristics of the Hippocampus of White Rats in the Acute Period After Severe Traumatic Brain Injury During the Use of L-lysine Aescinat

*I.P. Koshman<sup>1</sup>, A.Yu. Shoronova<sup>1</sup>, S.S. Stepanov<sup>1</sup>, A.G. Kalinichev<sup>1</sup>, V.A. Akulinin<sup>1</sup>, A.S. Stepanov<sup>2</sup>, D.B. Avdeyev<sup>1\*</sup>, V.L. Molchanova<sup>2</sup>*

Department of Histology, Cytology and Embryology

<sup>1</sup> Omsk State Medical University

12 Lenina St., Omsk 644099, Russian Federation

<sup>2</sup> Clinical Oncological Dispensary

9/1 Zaver'yaeva St., Omsk 644013, Russian Federation

\* **Contacts:** Dmitry B. Avdeyev, Candidate of Veterinary Sciences, Senior Lecturer at the Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University.  
 Email: [avdeev86@inbox.ru](mailto:avdeev86@inbox.ru)

## AIM OF STUDY

The study is devoted to the effect of L-lysine aescinat on the nervous tissue of the CA1 and CA3 fields of the hippocampus of the brain of white rats in the acute period after severe traumatic brain injury (TBI).

## MATERIAL AND METHODS

TBI was simulated by applying a blow to the parieto-occipital region with a freely falling weight weighing 200-250 grams from a height of 50 cm using a special rail rack. The objectives of the study were: 1) comparative morphometric assessment of the degree of hydration, cyto- and glioarbitectonics of different layers of CA1 and CA3 fields after ischemia without treatment; 2) the effect of L-lysine aescinat on these indicators. We used histological (staining of sections with hematoxylin-eosin and Nissl), immunohistochemical (for NSE, MAP-2 and GFAP) and morphometric methods. On thin (4 µm) serial frontal sections of the hippocampus, neurons, astrocytes, microvessels and neuropiles were studied in control (intact animals, n=5) and 1 and 3 days after injury without treatment (n=10, comparison group) and with treatment (n = 10, main group). The number density of neurons was determined using the Nissl staining of cells and by the reaction to NSE. The cytoskeleton of neurons was studied by detecting MAP-2, and astroglia by GFAP. On color raster images (staining with hematoxylin and eosin, x100) using the Find Maxima plug-in filter, the zones of maximum brightness were determined, which were then analyzed using Analyze Particles from the ImageJ 1.52s program. Zones of maximum brightness corresponded to areas of the hippocampus with a high degree of hydration of the nervous tissue - edema-swelling. The nature of the distribution, statistical hypotheses, and plotting were checked using Statistica 8.0 software and R environment.

**RESULTS** In control animals, normochromic neurons without signs of changes in the cytoskeleton prevailed in all layers of fields CA1 and CA3, and a low degree of hydration of the nervous tissue was noted (the relative proportion of zones of maximum brightness was 5–8%). One and 3 days after TBI, there was a statistically significant increase in the focal content of dystrophic and necrobiologically altered neurons (95% confidence interval: 52–78%), manifestations of reactive gliosis were noted, and the proportion of zones of maximum brightness increased to 16%. Statistically significant layer-by-layer differences were revealed between the CA1 and CA3 fields of the hippocampus. The use of L-lysine aescinat had a statistically significant effect on the morphometric parameters of the nervous tissue of the hippocampus.

**CONCLUSION** In the early post-traumatic period after TBI, the degree of hydration of the nervous tissue of the hippocampus increased. Heteromorphicity of dystrophic and necrobiological changes in different layers of CA1 and CA3 fields was noted. L-lysine aescinat had a statistically significant positive effect on these changes. To a greater extent, this is typical for the CA3 field. The revealed changes are considered not only as patho-, but also as sanogenetic structural mechanisms of protection and reorganization of the hippocampus in the acute post-traumatic period.

1. In the acute period (1–3 days) after severe traumatic brain injury, the degree of hydration of all components of the hippocampal nervous tissue increased. In the group without treatment, 3 days after injury, the relative volume of edema-swelling zones varied from 10 to 13% in CA1 (control 3-7%) and from 8 to 16% in CA3 (control 5–10%).

2. The heteromorphism of hydropic changes in the molecular layer, the layer of pyramidal neurons and the polymorphic layer was established. The maximum increase in the volume of free water (more than twofold) was characteristic of the molecular and polymorphic layer CA1, as well as the polymorphic layer CA3.

3. The use of L-lysine aescinat in the acute period significantly changed the manifestations of hydropic dystrophy. One day after injury, the volume of free water increased in comparison with animals without treatment, and then, after 3 days, decreased, but remained higher than in the comparison group. The maximum effect of the drug was noted in field CA3.

**Keywords:** traumatic brain injury, hippocampus, edema-swelling, immunohistochemistry, morphometry, in vivo study, Wistar rats, L-lysine aescinat

**For citation** Koshman IP, Shoronova AYU, Stepanov SS, Kalinichev AG, Akulinin VA, Stepanov AS, et al. Morphofunctional Characteristics of the Hippocampus of White Rats in the Acute Period After Severe Traumatic Brain Injury During the Use of L-lysine Aescinat. *Russian Sklifosovsky Journal of Emergency Medical Care*. 2020;9(4):529–538. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-4-529-538> (in Russ.)

**Conflict of interest** Authors declare lack of the conflicts of interests

**Acknowledgments, sponsorship** This work was supported by the Foundation for the Promotion of Innovation under the «UMNIK» program No. 14 dated December 15, 2017 and the internal grant No. 574 of the Omsk State Medical University dated November 24, 2017.

This work was carried out with the support of the Omsk State Medical University in the framework of training and certification of teaching and scientific staff

## Affiliations

Igor P. Koshman	Full-time postgraduate student of the Department of Neurology and Neurosurgery, Omsk State Medical University; <a href="https://orcid.org/0000-0002-9763-2981">https://orcid.org/0000-0002-9763-2981</a> , <a href="mailto:koshman.ip@gmail.com">koshman.ip@gmail.com</a> ; 20%, experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis
Anastasia Yu. Shoronova	Assistant of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University; <a href="https://orcid.org/0000-0002-0936-3137">https://orcid.org/0000-0002-0936-3137</a> , <a href="mailto:nastasya1994@mail.ru">nastasya1994@mail.ru</a> ; 20%, experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis
Sergey S. Stepanov	Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University; <a href="https://orcid.org/0000-0003-0741-3337">https://orcid.org/0000-0003-0741-3337</a> , <a href="mailto:serg_stepanov@mail.ru">serg_stepanov@mail.ru</a> ; 20%, experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis
Alexey G. Kalinichev	Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Neurology and Neurosurgery, Omsk State Medical University; <a href="https://orcid.org/0000-0002-2534-6329">https://orcid.org/0000-0002-2534-6329</a> , <a href="mailto:akalinichev59@gmail.com">akalinichev59@gmail.com</a> ; 10%, experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and informational-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis
Viktor A. Akulinin	Doctor of Medical Sciences, Professor, Head. department histology, cytology and embryology, Omsk State Medical University; <a href="https://orcid.org/0000-0001-6097-7970">https://orcid.org/0000-0001-6097-7970</a> , <a href="mailto:akulinin@omsk-osma.ru">akulinin@omsk-osma.ru</a> ; 10%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and informational-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis
Alexander S. Stepanov	Candidate of Medical Sciences, oncologist of the highest category of the surgical department No. 2 of Clinical Oncological Dispensary; <a href="https://orcid.org/0000-0002-8392-9514">https://orcid.org/0000-0002-8392-9514</a> , <a href="mailto:ctepan55@yandex.ru">ctepan55@yandex.ru</a> ; 10%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and informational-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis
Dmitry B. Avdeyev	Candidate of Veterinary Sciences, Senior Lecturer at the Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University; <a href="https://orcid.org/0000-0003-4976-7539">https://orcid.org/0000-0003-4976-7539</a> , <a href="mailto:avdeev86@inbox.ru">avdeev86@inbox.ru</a> ; 5%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis
Valentina L. Molchanova	Medical assistant-laboratory assistant of the pathological department of Clinical oncological dispensary; <a href="mailto:molchanova.v.l@mail.ru">molchanova.v.l@mail.ru</a> ; 5%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis