

Научная статья

УДК 616.831–001–091.8: 612.017.1  
 doi:10.18499/2225-7357-2023-12-3-86-95  
 1.5.22 – клеточная биология  
 3.3.2 – патологическая анатомия



## Иммуногистохимическая характеристика реорганизации глиальных клеток неокортекса в результате тяжелой черепно-мозговой травмы

С. С. Степанов<sup>1</sup>, А. Ю. Шоронова<sup>1</sup>, В. А. Акулинин<sup>1✉</sup>, М. С. Коржук<sup>2</sup>,  
 Л. М. Макарьева<sup>1</sup>, Д. Б. Авдеев<sup>1</sup>, Л. В. Степанова<sup>1</sup>, И. Г. Цускман<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Омский государственный медицинский университет Минздрава России, Омск, Россия

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация.** Цель исследования – изучить реорганизацию глиоцитов и экспрессию GFAP в неокортексе крыс с помощью гистологических, иммуноморфологических и морфометрических методов (в частности фрактального анализа) после тяжелой черепно-мозговой травмы (ТЧМТ). **Материал и методы.** Моделирование ТЧМТ проводили при помощи запатентованного устройства с ударным механизмом, основанного на принципе передачи кинетической энергии падающего цилиндрического груза. В ходе эксперимента крысы были разделены на 2 группы: основную (n=30) и контрольную (интактную, n=6). Головной мозг у крыс извлекали через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после травмы. Оценку глиоцитов слоев III и V сенсомоторной коры (СМК) проводили путем анализа гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, тионином при помощи световой микроскопии, иммуногистохимической реакции на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) и морфометрической обработки в программе Image 1.53. Фрактальный анализ астроцитарной сети осуществляли с помощью плагина FracLac 2.5. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью непараметрических методов в программе Statistica 10.0. **Результаты.** На всем протяжении посттравматического периода изменения нейронов СМК сопровождались увеличением численной плотности глиоцитов. Максимальные значения содержания микроглиоцитов регистрировались уже через 1 сут после ТЧМТ. В слое III СМК их доля увеличивалась на 13,4%, а в слое V СМК – на 24,2% по сравнению с контролем. Минимальный показатель численной плотности олигодендроцитов отмечался через 30 сут после ТЧМТ: в слое III СМК его значение было на 32,2% ниже, а в слое V СМК – на 43,9% ниже, чем в контроле. Через 1 сут после травмы происходило статистически значимое увеличение численной плотности астроцитов в слоях III и V СМК выше контрольных значений. В течение 30 сут, содержание глиоцитов уменьшалось: в слое III СМК – на 23%, а в слое V СМК – на 26,8%. При экспрессии GFAP в слое III и V СМК встречались протоплазматические и волокнистые астроциты, отличающиеся размером тела и длиной отростков. Показатели, характеризующие отростки, как пространственный объект, статистически значимо изменялись в сравнении с контролем и в посттравматическом периоде между сроками. Наиболее сильно изменялась фрактальная размерность и отмечалась высокая лакуарность в слое III СМК. В течение 14 сут показатель был меньше контрольного значения, а в слое V СМК к этому сроку он восстанавливался. Наблюдаемые явления свидетельствовали о более высокой реактивной реорганизации отростков астроцитов мелкоклеточного слоя III СМК крыс. **Заключение.** После ТЧМТ в СМК прослеживалась неоднородная реорганизация нейроглиального комплекса. Обнаруженные изменения численной плотности глиоцитов в слоях III и V СМК на протяжении всего посттравматического периода имели гетерохронный характер. Данные морфометрического анализа подтверждали пространственную реорганизацию астроцитов, активную пролиферацию микроглиоцитов и олигодендроцитов – изменений, способствующих компенсаторной защите структур нервной ткани СМК в условиях посттравматического периода.

**Ключевые слова:** неокортекс; астроциты; сенсомоторная кора; иммуногистохимия; черепно-мозговая травма

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Степанов С.С., Шоронова А.Ю., Акулинин В.А., Коржук М.С., Макарьева Л.М., Авдеев Д.Б., Степанова Л.В., Цускман И.Г. Иммуногистохимическая характеристика реорганизации глиальных клеток неокортекса в результате тяжелой черепно-мозговой травмы // Журнал анатомии и гистопатологии. 2023. Т. 12, №3. С. 86–95. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2023-12-3-86-95>

## ORIGINAL ARTICLES

Original article

# Immunohistochemical Characteristics of Glial Cells Reorganization in Neocortex as a Result of Severe Traumatic Brain Injury

S. S. Stepanov<sup>1</sup>, A. Yu. Shorono<sup>1</sup>, V. A. Akulinin<sup>1</sup>✉, M. S. Korzhuk<sup>2</sup>,  
L. M. Makarieva<sup>1</sup>, D. B. Avdeev<sup>1</sup>, L. V. Stepanova<sup>1</sup>, I. G. Tsuskman<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

**Abstract.** The aim was to study the reorganization of gliocytes and GFAP expression of the rat neocortex using histological, immunomorphological and morphometric methods (in particular fractal analysis) after severe traumatic brain injury (STBI). **Material and methods.** Modeling of STBI was performed using a patented device with a shock mechanism based on the principle of transferring kinetic energy of a falling cylindrical load. During the experiment, the rats were divided into 2 groups: main (n=30) and control (intact, n=6). The brain of rats was extracted after 1, 3, 7, 14 and 30 days after heavy traumatic brain injury. The assessment of the glia of layers III and V of the sensorimotor cortex (SMC) was carried out by analyzing histological preparations of the rat brain (stained with hematoxylin-eosin and thionin) using light microscopy, immunohistochemical reaction to glial fibrillary acid protein (GFAP) and morphometric processing in the Image 1.53 program. Fractal analysis was performed using the FracLac 2.5 plugin to evaluate the astrocyte network. Statistical processing of the data obtained was carried out using nonparametric methods of information processing of the application package Statistica 10.0 programs. **Results.** Throughout the post-traumatic period, changes in the SMC neurons were accompanied by an increase in the numerical density of gliocytes. The maximum peak of the microglyocyte content was higher already 1 day after HTBI: by 13.4% in layer III of the SMC and by 24.2% in layer V of the SMC. The minimum indicator of the numerical density of oligodendrocytes was observed 30 days after HTBI: in layer III of the SMC by 32.2%, and in layer V of the SMC – 43.9%. 1 day after the injury, there was a statistically significant increase in the numerical density of astrocytes in layers III and V of the SMC above the control values. During 30 days, the content of gliocytes decreased: in layer III of the SMC – 23%, and in layer V of the SMC – 26.8%. When GFAP was expressed, protoplasmic and fibrous astrocytes differing in body size and length of processes were found in layer III and V of the SMC. The indicators characterizing the appendages as a spatial object changed statistically significantly in comparison with the control and in the post-traumatic period between terms. The fractal dimension changed the most and a high lacunarity was observed in layer III of the SMC. For 14 days, the indicator was less than the reference value, and by this time it was already recovering in layer V of the SMC. Taken together, all this indicated a higher reactive reorganization of the processes of astrocytes of the small cell layer of the III SMC. **Conclusion.** After a heavy traumatic brain injury, a heterogeneous reorganization of the neuroglial complex was observed in the sensorimotor cortex (SMC). The detected changes in the numerical density of gliocytes in layers III and V of the SMC throughout the post-traumatic period were heterochronous. Morphometric analysis data confirmed the spatial reorganization of astrocytes, active proliferation of microglyocytes and oligodendrocytes – changes that contribute to the compensatory protection of the structures of the nervous tissue of the SMC in the post-traumatic period.

**Keywords:** neocortex; gliocytes; astrocytes; sensorimotor cortex; immunohistochemistry; traumatic brain injury

**Conflict of interests:** the authors declare no conflict of interests.

**For citation:** Stepanov S.S., Shorono A.Yu., Akulinin V.A., Korzhuk M.S., Makarieva L.M., Avdeev D.B., Stepanova L.V., Tsuskman I.G. Immunohistochemical characteristics of glial cells reorganization in neocortex as a result of severe traumatic brain injury. Journal of Anatomy and Histopathology. 2023. V. 12, №3. P. 86–95. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2023-12-3-86-95>

## Введение

Качественный и количественный анализ структурных компонентов нервной системы считается важным подходом к пониманию клеточного состава, развития и эволюции мозга, неврологических и психиатрических заболеваний [17, 22, 23, 24, 28].

Поддержание жизнеспособности нейронов головного мозга и обеспечение контакта между нервными клетками происходит с участием глиальных клеток. Поэтому важным является иммуногистохимическое определение экспрессии антител к различным видам нейроглии. Как известно, глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP) – высокоспециализированный белок, локализованный в

центральной нервной системе (ЦНС), является основным промежуточным филаментом в астроцитарной глии [8, 35].

При этом GFAP участвует в ряде важных процессов в ЦНС, включая межклеточную коммуникацию и регуляцию гематоэнцефалического барьера. Данный нейропептид участвует в митозе, регулируя внутриклеточные сети нейрофиламентов, что имеет решающее значение при любом начальном повреждении мозга. Содержание этого высокоспециализированного белка может служить прогностическим критерием или маркером, поскольку черепно-мозговая травма любого патогенеза сопровождается изменениями экспрессии GFAP, которые коррелируют со степенью повреждения нервной ткани. Поскольку GFAP

является прогностическим критерием при патологических процессах в ЦНС [29, 36], логично было предположить, что экспрессия содержания этого белка будет различаться у экспериментальных животных на разных стадиях посттравматического периода. В то же время GFAP играет важную роль в процессе реактивного астроглиоза и восстановительных процессах после травматического повреждения мозга [25, 36].

Обзор публикаций, посвященных проблеме патоморфологических изменений в ЦНС на фоне черепно-мозговых травм, показывает неоднозначность и сложность трактовки имеющихся сведений о процессах ремоделирования нейроглии в головном мозге [15, 18, 26, 30, 34]. Исходя из актуальности поставленной проблемы, целью исследования было изучение реорганизации глиоцитов и экспрессии GFAP в неокортексе крыс с помощью гистологических, иммуноморфологических и морфометрических методов после ТЧМТ.

### Материал и методы исследования

Моделирование эксперимента выполнено на базе кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «ОмГМУ» Минздрава Российской Федерации на основании директивы Европейского Парламента №2010/63/E от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей» и с учетом рекомендаций Международного комитета по работе с лабораторными животными, поддержанных ВОЗ. Эксперимент одобрен локальным этическим комитетом ОмГМУ (протокол № 112 от 26.09.2019г.). В ходе опыта использовали аутбредных половозрелых крыс – самцов (n=63) сток Wistar массой 350–400 г. Общая смертность крыс в опыте составила 47,3% (n=27).

В работах отечественных и зарубежных авторов описано разнообразие способов травматического воздействия на головной мозг [2, 11, 21, 31]. Для проведения эксперимента использовали оригинальный авторский метод моделирования травмы с применением специального устройства с ударным механизмом, основанном на принципе передачи кинетической энергии падающего цилиндрического груза (патент № 2788904 от 25.10.2021) [5]. Тяжелое повреждение мозга обеспечивалось благодаря дозированному механическому воздействию свободно падающим цилиндрическим грузом массой 598 г с высоты 35 см на затылочно-теменную область головы и расчета потенциальной энергии удара, по формуле:

$$E \text{ удара} = m \times g \times h = 0,598 \times 9,8 \times 0,35 = 2,05 \text{ Дж},$$

где  $m$  – масса падающего груза,  $g$  – ускорение свободного падения,  $h$  – высота (расстояние от точки начала падения до верхнего края втулки, расположенной на планке).

Эксперименты на животных проводили с предварительной обязательной анестезией путем в/м введения препарата Zoletil 100 в дозе 10 мг/кг. Признаки полной аналгезии и миорелаксация свидетельствовали о наступлении глубокой фазы наркоза, необходимой для дальнейшего проведения эксперимента. Крыс фиксировали на операционном столе с обязательным подкладыванием под голову амортизирующей губчатой подушечки, предотвращающей перелом челюсти при ударе. В качестве контроля использовали интактных крыс (n=6) без моделирования тяжелой черепно-мозговой травмы (ТЧМТ), а выживших крыс исследовали через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после тяжелого шока от удара (n=30).

Головной мозг для дальнейшего исследования забирали под анестезией, промывая сосудистое русло головного мозга медленным введением 0,9% раствора NaCl (100–125 мл) и Фрагмина (5000 единиц) в левый желудочек сердца. Фиксацию головного мозга проводили перфузией 30 мл раствора 4% формальдегида (фосфатный буфер, pH 7,2–7,4) под давлением 90–100 мм рт. ст. в течение 15 мин, с последующим извлечением мозга и хранением его в среде фиксатора при температуре 3–5°C. Спустя 24 ч головной мозг заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX) при помощи гистопроцессора карусельного типа STP-120. Толщина 2–4 мкм и точность гистологического среза материала обеспечивались при помощи микротомы HM 450 (Thermo FS) на уровне от 1,2 – (–3,0) до 2,2 – (–4,8) от Брегмы [32].

Морфологическое описание и количественный анализ организации неокортекса проводились с использованием серийных цифровых микрофотографий образцов, окрашенных гематоксилином и эозином и тионином по методу Ниссля, полученных на микроскопе Leica DM1000 с высоким разрешением (tiff, 2592×1944 пикселей) и обработанных в Photoshop CC с использованием фильтра Camera RAW (стандартные резкость, контрастность и баланс белого), при увеличении размерности изображений до 3780×2835 пикселей/см, и разрешением 600 пикселей/дюйм.

Нейроглию идентифицировали с помощью иммуногистохимической реакции на GFAP используя готовые моноклональные антитела мыши (клон GA5; изотоп иммуноглобулина IgG1) (Leica Biosystems Newcastle Ltd., Великобритания). Полученные после взаимодействия с первичными антителами гистологические срезы сенсомоторной коры (СМК) инкубировали со вторичными антителами и хромогенным агентом DAB (3,3'-диаминобензидином), докрасив гематоксилином, заключали в полистирол. С целью визуализации применяли мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System

(Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

В процессе морфометрического анализа клеток СМК определяли общую численную плотность нейронов (ОЧПН) и глиальных клеток (ОЧПГК). Фрактальный анализ изображений астроцитов осуществляли с помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods) для оценки пространственной организации астроцитарной сети [1, 9, 13, 27]. Определяли фрактальную размерность (ФР – показатель заполнения пространства фрактальной структурой) и лакуарность (Л – меру неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой). Это позволило получить более расширенную количественную характеристику астроцитов, включая оценку их площади, а также форму и распределение отростков в пространстве.

В используемом алгоритме ImageJ 1.53c фрактальная размерность вычислялась по формуле:

$$D = \frac{\lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} (1n N_{\varepsilon})}{1n \varepsilon}$$

где  $\varepsilon$  – размер ячейки сетки,  $N_{\varepsilon}$  – количество ячеек размера  $\varepsilon$ , содержащих пиксели изображения астроцита.

Лакуарность вычислялась по формуле:

$$\Lambda = \left( \frac{\sigma}{\mu} \right)^2$$

где  $\sigma$  – стандартное отклонение массы (для бинарного изображения – количество пикселей) фрактальной структуры в ячейках сетки заданного размера  $\varepsilon$ ;  $\mu$  – среднее значение массы структуры в ячейках заданного размера  $\varepsilon$ .

Мерой лакуарности в используемой программе (FracLac 2.5) являлось изменение интенсивности плотности изображения GFAP-положительных структур астроцитов при сканировании на сетке с различным размером ячеек. Высокий показатель лакуарности означал, что имеется большое количество областей, не содержащих GFAP-положительные клетки. Полученные результаты экспортировались в Excel для дальнейшей статистической обработки, аналогично ранее опубликованным работам [9, 12, 13, 14].

Распределение вариационных рядов переменных, использованных в данном исследовании, отличалась от нормального (Kolmogorov–Smirnov test, Shapiro–Wilk test,  $p < 0,05$ ). Поэтому проверка статистических гипотез проводилась с использованием непараметрических критериев по следующим направлениям: одиночные парные сравнения (между независимыми выборками – Mann–Whitney U-test, между зависимыми выборками – Wilcoxon test), множественные сравнения в динамике посттравматического периода на 1, 3, 7, 14 и 30 сут (ANOVA Kruskal–Wallis). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием приклад-

ной программы пакета StatSoft Statistica 10.0. Количественные данные в исследовании представлены как медиана (Me – 50% квартиль, Q2), интерквартильный разброс (Q1–Q3 – 25–75% квартили), (Min–Max), относительные значения (%) пересчитывали из абсолютных [3].

## Результаты и их обсуждение

У контрольной группы животных нейрорпилей слоев III и V СМК был представлен однородной структурой без признаков дегидратации и реактивного глиоза, отмечались типичные нормохромные пирамидные нейроны с крупным ядром, содержащим ядрышко и небольшое количество равномерно распределенного гетерохроматина (рис. 1а, б). Среди глиальных клеток присутствовали неактивные микроглиоциты с овальным ядром и тонкими отростками, входящими в состав глио-микроваскулярных комплексов, свободно расположенных в нейрорпиле. При этом на контрольных срезах наблюдали бинуклеарный клеточный состав, в которых ядра микроглиоцитов контактировали с ядрами нейронов, что свидетельствует о глубокой инвазии микроглиальных клеток в перикарион.

При экспрессии глиального фибриллярного протеина в контроле отмечалось умеренное содержание равномерно распределенного хромогена с максимальной концентрацией вокруг кровеносных капилляров (рис. 1в, г). Астроциты имели округлую форму и содержали GFAP в узкой полоске цитоплазмы вокруг ядра. Этот тип глиоцитов обнаруживали в тесном контакте с перикарионом, но не в самом перикарионе. Тела и отростки астроцитов представлены в виде сети, заполняющей пространство между перикарионами СМК.

После ТЧМТ отмечали реорганизацию глиальных клеток, проявляющуюся изменением их численной плотности и нейроглиального отношения. При этом показатель численной плотности этого вида нейроглии достигал максимальных значений уже через 1 сут после ТЧМТ. В слое III СМК он увеличивался на 13,4%, в слое V СМК – на 24,2% по сравнению с группой контроля (рис. 2). Через 1 и 3 сут после ТЧМТ, вероятно, усиливалась функциональная активность микроглиоцитов, что проявлялось изменением формы клеток вплоть до потери отростков. Это облегчало их перемещение с целью фагоцитоза поврежденных или разрушенных нейронов [6, 10, 33]. Уменьшение количества микроглиоцитов отмечалось на 30-е сут после ТЧМТ в обоих слоях СМК (рис. 2), но восстановления показателя до уровня контрольных значений не происходило, что свидетельствовало об их высокой фагоцитарной активности в ответ на травматическое повреждение и в отдаленном периоде после ТЧМТ.

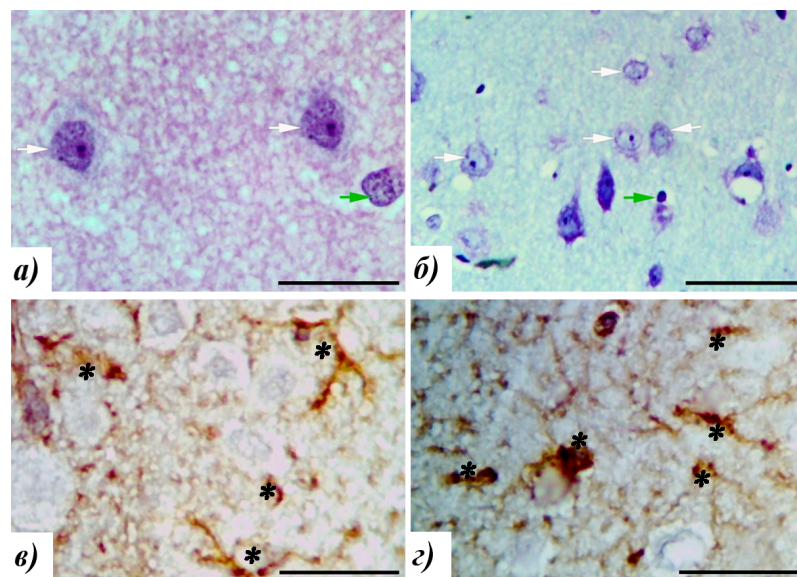


Рис. 1. Слой III СМК (а, в) и слой V СМК (б, г) контрольной группы: преобладают нормохромные нейроны (белые стрелки), встречаются глиоциты (зеленые стрелки) и участки умеренного содержания GFAP-позитивных клеток (\*). Окраска гематоксилином и эозином (а) и тионином (б); иммуногистохимическая реакция на GFAP (в, г). Об.100, шкала – 25 мкм.

Fig. 1. Layer III of the SMC (a, c) and layer V of the SMC (b, d) of the control group: normochromic neurons predominate (white arrows), there are gliocytes (green arrows) and areas of moderate content of GFAP-positive cells (\*). Staining with hematoxylin and eosin (a) and thionin (b); immunohistochemical reaction to GFAP (c, d). Ob. 100, scale – 25  $\mu$ m.

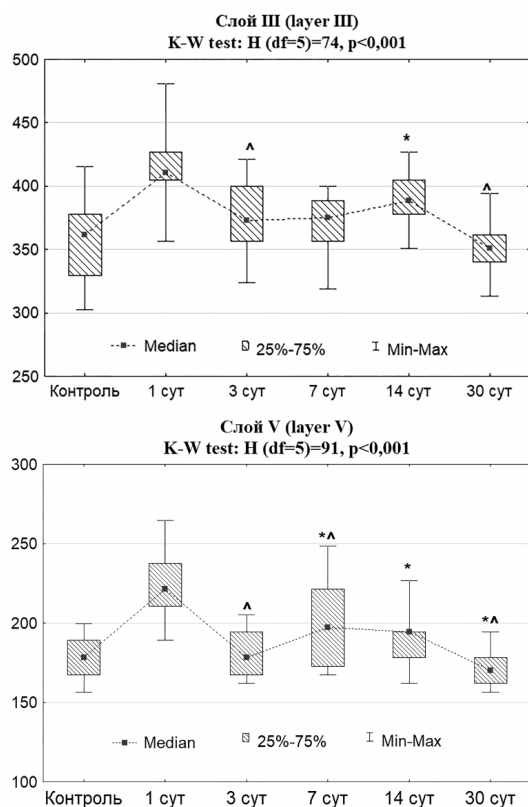


Рис. 2. Численная плотность микроглиоцитов в слоях III и V СМК (на 1 мм<sup>2</sup>) в контроле и посттравматическом периоде. Различия статистически значимы по сравнению с контролем (\*,  $p<0,001$ ), и предыдущим сроком (^,  $p<0,001$ ; Mann-Whitney U-test). Медиана (Q<sub>2</sub>), 25–75% квантили (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>) и Min–Max. K–W test – Kruskal–Wallis test (сравнение по срокам после травмы).

Fig. 2. Numerical density of microglia in layers III and V of the SMC (per 1 mm<sup>2</sup>) in the control and post-traumatic period. The differences are statistically significant compared to the control (\*,  $p<0,001$ ) and the previous period (^,  $p<0,001$ ; Mann-Whitney U-test). Median (Q<sub>2</sub>), 25–75% quartiles (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>) and Min–Max. K–W test – Kruskal–Wallis test (comparison by time after injury).

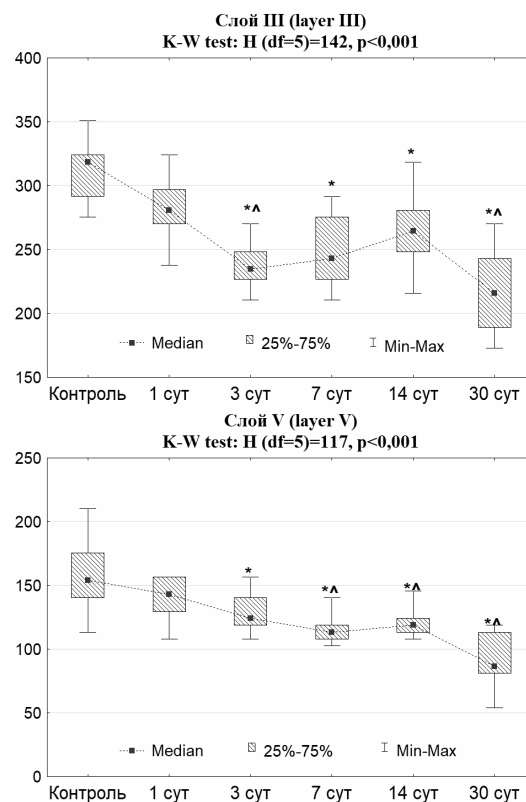


Рис. 3. Численная плотность олигодендроцитов в слоях III и V СМК (на 1 мм<sup>2</sup>) в контроле и посттравматическом периоде. Различия статистически значимы по сравнению с контролем (\*,  $p<0,001$ ), и предыдущим сроком (^,  $p<0,001$ ; Mann-Whitney U-test). Медиана (Q<sub>2</sub>), 25–75% квантили (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>) и Min–Max. K–W test – Kruskal–Wallis test (сравнение по срокам после травмы).

Fig. 3. Numerical density of oligodendrocytes in layers III and V of the SMC (per 1 mm<sup>2</sup>) in the control and post-traumatic period. The differences are statistically significant compared to the control (\*,  $p<0,001$ ) and the previous period (^,  $p<0,001$ ; Mann-Whitney U-test). Median (Q<sub>2</sub>), 25–75% quartiles (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>) and Min–Max. K–W test – Kruskal–Wallis test (comparison by time after injury).



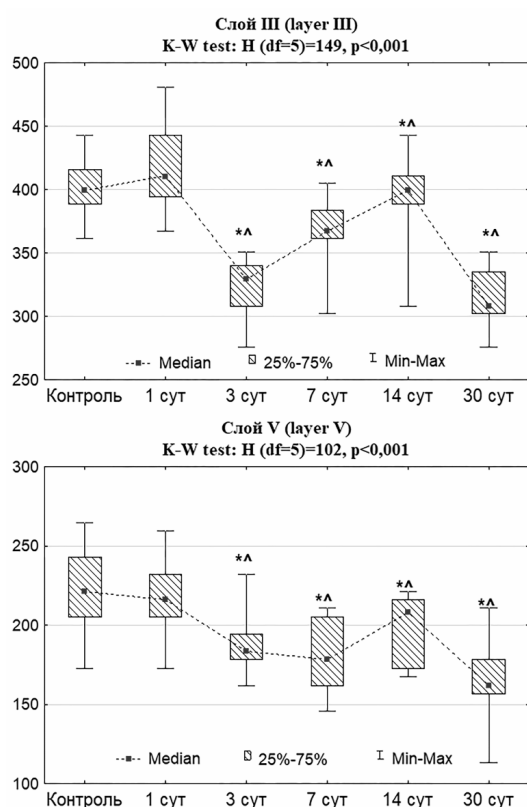


Рис. 4. Численная плотность астроцитов в слоях III и V СМК (на 1 мм<sup>2</sup>) в контроле и посттравматическом периоде. Различия статистически значимы в сравнение с контролем (\*,  $p < 0,001$ ), и предыдущим сроком (^,  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U-test). Медиана ( $Q_2$ ), 25–75% квартили ( $Q_1$ – $Q_3$ ) и Min-Max. K-W test – Kruskal-Wallis test (сравнение по срокам после травмы).

Fig. 4. Numerical density of astrocytes in layers III and V of the SMC (per 1 mm<sup>2</sup>) in the control and post-traumatic period. The differences are statistically significant in comparison with the control (\*,  $p < 0,001$ ), and the previous period (^,  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U-test). Median ( $Q_2$ ), 25–75% quartiles ( $Q_1$ – $Q_3$ ) and Min-Max. K-W test – Kruskal-Wallis test (comparison by time after injury).

На всем протяжении посттравматического периода (1-е – 30-е сут) происходило постепенное снижение количества олигодендроцитов, в отличие от двух других типов глиоцитов. Максимальное снижение их содержания отмечалось через 30 сут после ТЧМТ: в слое III СМК на 32,2%, а в слое V СМК – 43,9% (рис. 3). Вероятно, процесс саногенеза нервной ткани обеспечивает ее максимально полное структурно-функциональное восстановление только в сочетании активации всех типов глиальных клеток.

Через 1 сут после ТЧМТ происходило статистически значимое увеличение численной плотности астроцитов в слоях III и V СМК выше контрольных значений (Mann-Whitney U-test,  $p = 0,0001$ ). Затем, в течение 30 сут содержание глиоцитов уменьшалось: в слое

III СМК – на 23%, а в слое V СМК – 26,8% (рис. 4).

Известно, что в сером веществе СМК выделяют протоплазматические и волокнистые астроциты, участвующие в регуляции уровня внеклеточного глутамата,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, аденозина и синаптической пластичности [7, 14]. На гистологических препаратах в слое III и V СМК, окрашенных с помощью GFAP, встречались оба вида астроцитов, причем протоплазматические характеризовались наличием достаточно крупного тела с короткими и толстыми отростками, а волокнистые – маленьким телом с длинными и тонкими отростками (рис. 5).

Форма отростков и степень заполнения ими окружающего пространства нейропиля значимо различались в разные сроки посттравматического периода (рис. 6). Астроциты имели характерный вид древовидной структуры, занимающей пространственную область, в которой на фронтальных срезах визуализировались тело клетки с отростками.

Согласно литературным данным, гипертрофия астроцитов является следствием реакции клетки на нарушения ионного гомеостаза и энергетического баланса после травмы. В ответ на тяжелое постишемическое повреждение астроциты пытаются стабилизировать баланс межклеточного вещества и жидкости [4, 16]. Показано, что совместно с астроцитами активируются и другие глиальные клетки как компоненты единой интегрированной клеточной системы головного мозга. Предположительно это необходимо для сохранения и восстановления нервной ткани после повреждения, что способствует активации интактных нейронов и функциональному замещению погибших нейронов [10, 12].

Учитывая пространственные и временные особенности реакции клеток на травму, логично предположить, что в патологически измененной СМК формируются сложные клеточные комплексы, включающие нейроны и глиальные клетки в процессе клеточно-фагоцитозных и других видов взаимоотношений. При этом каждый тип глиальных клеток играет особую роль в этих взаимоотношениях: микроглиоциты поглощают строму и апикальные отростки поврежденных и разрушенных нейронов, астроциты – их мелкие дендритные отростки, олигодендроциты обеспечивают последующую репарацию аксонов сохранившихся нервных клеток [19, 20]. Совместная деятельность различных видов нейроглии, вероятно, обеспечивает адаптацию и репаративную реорганизацию нервной ткани в целом [1].

Для изучения пространственной реорганизации отростков астроцитов после ТЧМТ использован метод фрактального анализа их бинарных изображений, ранее использованный нами при изучении реакции астроцитов

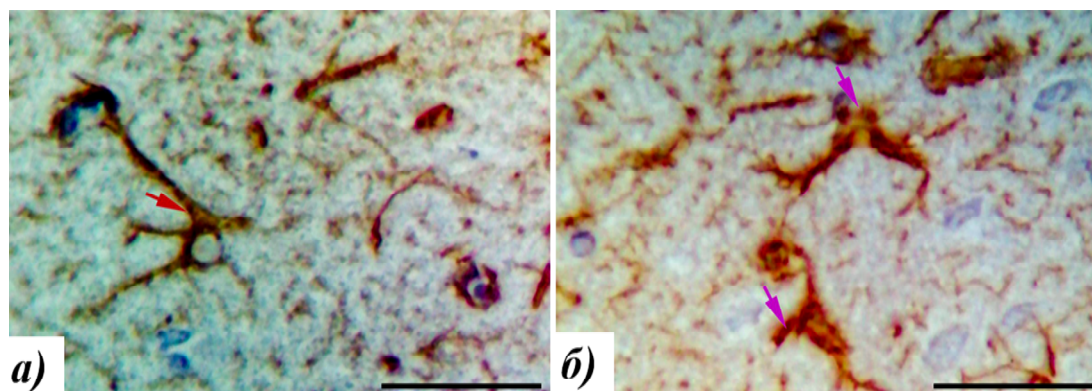


Рис. 5. Фрагменты СМК (а, б) через 3 сут после ТЧМТ: волокнистый астроцит (красная стрелка), протоплазматические астроциты (розовые стрелки). Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP. Об.100, шкала – 25 мкм.

Fig. 5. SMC fragments (a, б) 3 days after STBI: fibrous astrocyte (red arrow), protoplasmic astrocytes (pink arrows). Staining: immunohistochemical reaction for GFAP. Ob. 100, scale – 25 μm.

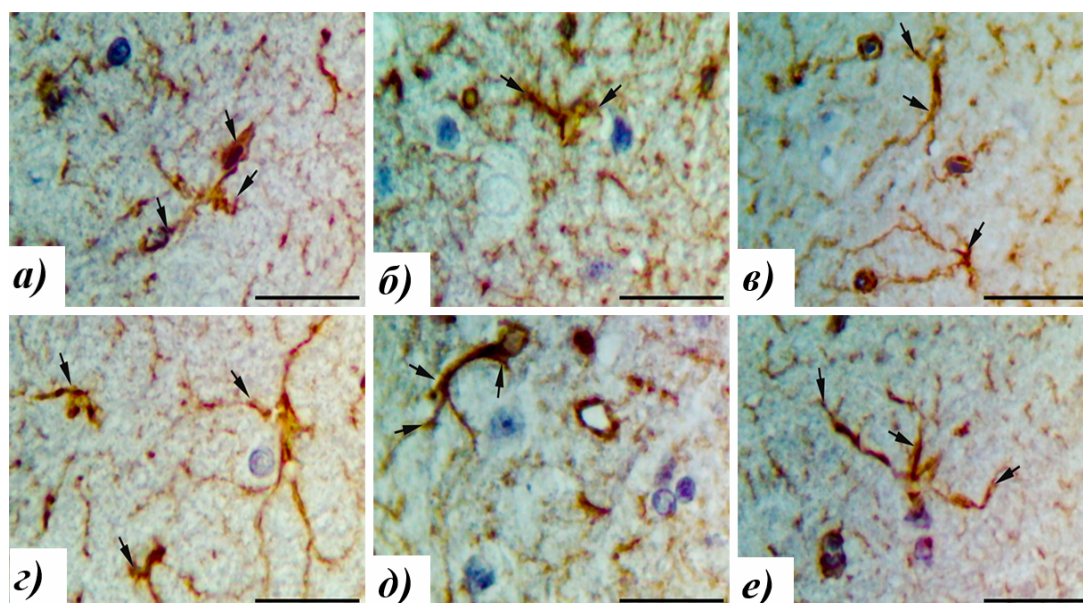


Рис. 6. Слой III СМК (а, б, в) и слой V СМК (г, д, е) через 1 (а, г), 7 (б, д), 14 (в, е) сут после ТЧМТ. Разная степень гипертрофии отростков астроцитов (черные стрелки). Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP. Об.100, шкала – 20 мкм.

Fig. 6. Layer III of the SMC (a, б, в) and layer V of the SMC (г, д, е) 1 (а, г), 7 (б, д), 14 (в, е) days after STBI. Varying degrees of hypertrophy of astrocyte processes (black arrows). Staining: immunohistochemical reaction for GFAP. Ob. 100, scale – 20 μm.

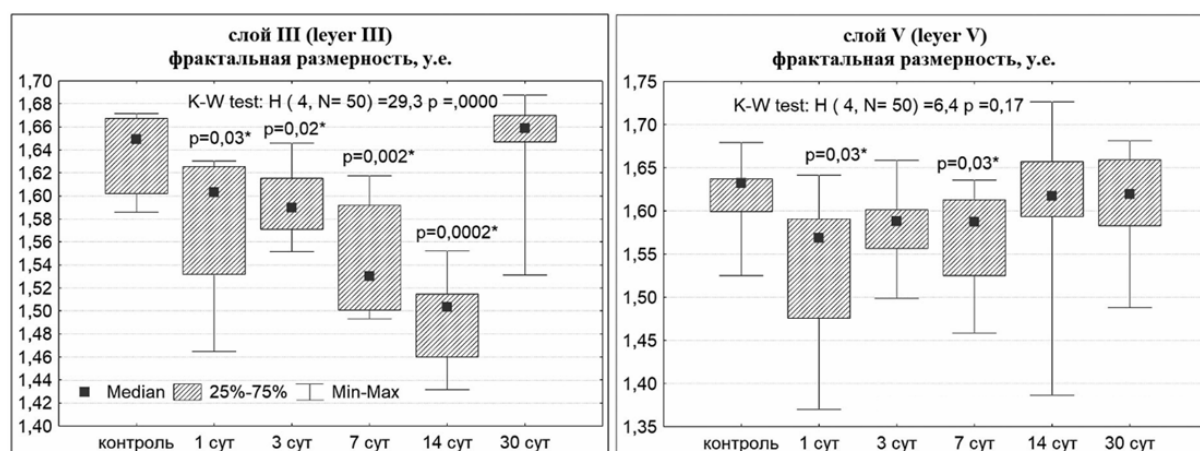


Рис. 7.

## Продолжение рисунка 7

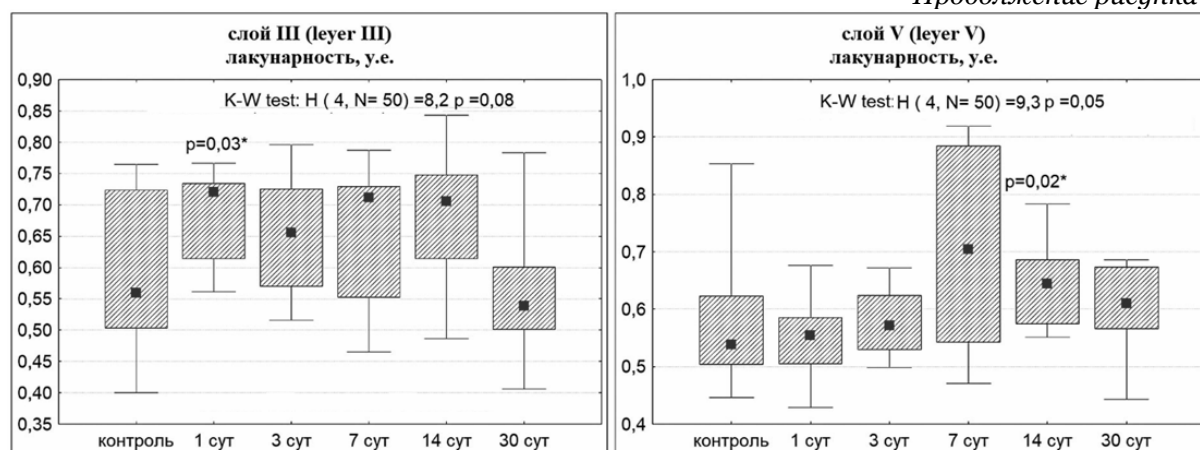


Рис. 7. Показатели фрактального анализа отростков астроцитов в слоях III и V СМК в контроле и посттравматическом периоде. Различия статистически значимы по сравнению с контролем (Mann–Whitney U-test,  $p<0.05$ ). Медиана ( $Q_2$ ), 25–75% квантили ( $Q_1$ – $Q_3$ ) и Min–Max. K–W test – Kruskal–Wallis test (сравнение всех сроков после травмы).

Fig. 7. Indicators of fractal analysis of astrocyte processes in layers III and V of the SMC in the control and post-traumatic period. The differences are statistically significant compared to the control (Mann–Whitney U-test,  $p<0.05$ ). Median ( $Q_2$ ), 25–75% quartiles ( $Q_1$ – $Q_3$ ) and Min–Max. K–W test – Kruskal–Wallis test (comparison of all periods after injury).

на острую ишемию [9, 12, 13].

Установлено, что после ТЧМТ показатели, характеризующие отростки как пространственный объект, статистически значимо изменялись в сравнении с контролем и в посттравматическом периоде между сроками. При этом наиболее сильно изменялась фрактальная размерность в слое III СМК (рис. 7). В течение 14 сут показатель был меньше контрольного значения, а в слое V СМК к этому времени он восстанавливался. Для слоя III была характерна самая высокая лакунарность после ТЧМТ. В совокупности это свидетельствовало о более высокой реактивной реорганизации отростков астроцитов мелкоклеточного слоя III СМК. Ранее нами установлено, что именно для этого слоя характерно максимальное повреждение пирамидных нейронов [9, 14].

### Заключение

После тяжелой черепно-мозговой травмы в сенсомоторной коре прослеживается неоднородная реорганизация нейроглиального комплекса. Обнаруженные изменения численной плотности глиоцитов в слоях III и V СМК на протяжении всего посттравматического периода носят гетерохронный характер. Данные фрактального и морфометрического анализа подтверждают пространственную реорганизацию отростков астроцитов, активную пролиферацию микроглиоцитов и олигодендроцитов. Все это способствует адаптации и компенсаторной реорганизации структур нервной ткани СМК головного мозга в условиях посттравматического воздействия.

### Список источников / References

1. Аврущенко М.Ш., Острова И.В. Постреанимационные изменения экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF): взаимосвязь с процессом гибели нейронов. Общая реаниматология. 2017;13(4):6–21. Avrushchenko MS, Ostrova IV. Postresuscitative Changes of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein Expression: Association With Neuronal Death. General Reanimatology. 2017;13(4):6–21. (In Russ.) doi: 10.15360/1813-97792017-4-6-21
2. Белошицкий В.В. Принципы моделирования черепно-мозговой травмы в эксперименте. Украинский нейрохирургический журнал. 2008;4:9–15. Biloshitsky VV. The Principles of Experimental Traumatic Brain Injury Modelling. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2008 Nov; 4: 9–15. (In Russ.)
3. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере. 2-ое изд. Санкт-Петербург: Питер; 2003. Borovikov V. Statistica. Iskusstvo analiza dannykh na komp'yutere. 2-oe izd. Saint-Petersburg: Piter; 2003. (In Russ.)
4. Калинина Ю.А., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Астроциты и их участие в механизмах терапевтического действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга. Гены и клетки. 2019;14(1):33–40. Kalinina YA, Gilerovich EG, Korzhevskii DE. Astrocytes and their participation in the mechanisms of therapeutic action of MSC in ischemic brain injury. Genes & Cells. 2019 Mar 30;14(1):33–40. (In Russ.) doi: 10.23868/201903004
5. Кинзерский А.А., Шоронова А.Ю., Коржук М.С., Акулинин В.А., Макарьева Л.М. Патент



- РФ № 2788904; 2021.  
Kinzersky AA, Shoronova AY, Korzhuk MS, Akulinin VA, Makarieva LM. Patent RU № 2788904; 2021 (In Russ.).
6. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Власов Т.Д. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии. Морфология. 2012;141(2):28–32.  
Korzhevsky DE, Kirik OV, Sukhorukova EG, Vlasov TD. Structural Organization of Striatal Microgliaocytes Following Focal Ischemia. Morphology. 2012 June; 141(2):28–32. (In Russ.)
7. Кириченко Е.Ю., Логвинов А.К., Филиппова С.Ю., Арефьев Р.А., Семенина В.Г., Лысенко Л.В. Особенности строения нейроглио-сосудистых ансамблей в гломерулах обонятельной луковицы крысы. Цитология. 2020;62(4):278–85.  
Kirichenko EYu, Logvinov AK, Filippova SYu, Arefyev RA, Semynina VG, Lysenko LV. Structural features of neuro-glio-vascular ensembles in the glomeruli of the rat olfactory bulb. Tsitologiya. 2020 Jan 1;62(4):278–85. (In Russ.) doi: 10.31857/S0041377120040057
8. Краснов А.В. Астроцитарные белки головного мозга: структура, функции, клиническое значение. Неврологический журнал. 2012;1:37–42.  
Krasnov AV. Astrocytic Brain Proteins: Structure, Function and Clinical Relevance. Neurological Journal. 2012 Jan;1:37–42. (In Russ.)
9. Макарьева Л.М., Акулинин В.А., Коржук М.С., Степанов С.С., Шоронова А.Ю., и др. Структурно-функциональная реорганизация сенсорной коры при перевязке общих сонных артерий (экспериментальное исследование). Общая реаниматология. 2022 Oct;18(5):32–43.  
Makarieva LM, Akulinin VA, Korzhuk MS, Stepanov SS, Shoronova AY, et al. Structural and Functional Reorganization of the Sensorimotor Cortex During Ligation of the Common Carotid Arteries (Experimental Study). General Reanimatology. 2022 Oct;18(5):32–43. (In Russ.) doi: 10.15360/1813-9779-2022-5-32-43
10. Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. О регенерации мозга. Патогенез. 2018;16(1):83–91.  
Pal'tsyn AA, Sviridkina NB. About regeneration of the brain (Lecture II). Patogenez. 2018 Mar 20;(1):83–91. (In Russ.) doi: 10.25557/2310-0435.2018.01.83-91
11. Радьков И.В., Лаптев В.В., Плехова Н.Г. Технологии моделирования диффузной черепно-мозговой травмы. Современные проблемы науки и образования. 2018;4:1–9.  
Radkov IV, Laptev VV, Plekhova NG. Technologies of modeling the diffuse traumatic brain injury. Journal of Modern problems of science and education. 2018 Aug;4:1–9. (In Russ.)
12. 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):1135–47.  
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. I.M. Sechenov Russian Journal of Physiology. 2017 Oct;103(10):1135–47. (In Russ.)
13. Степанов С.С., Макарьева Л.М., Акулинин В.А., Коржук М.С., Шоронова А.Ю., и др. Сопоставление иммуногистохимического и ультраструктурного изучения реакции аксональных терминалей сенсорной коры белых крыс на перевязку общих сонных артерий. Журнал анатомии и гистопатологии. 2022;11(3):65–74.  
Stepanov SS, Makarieva LM, Akulinin VA, Korzhuk MS, Shoronova AY, et al. Comparison of the immunohistochemical and ultrastructural studies of the white rats sensorimotor cortex synaptic terminals reaction to common carotid arteries ligation. Journal of Anatomy and Histopathology. 2022 Oct;11(3):65–74 (In Russ.) doi: 10.18499/2225-7357-2022-11-3-65-74
14. Шоронова А.Ю., Акулинин В.А., Степанов С.С., Коржук М.С., Макарьева Л.М., и др. Морфофункциональные изменения нейронов, глиальных клеток и синапсов в сенсорной коре после тяжелой черепно-мозговой травмы. Журнал анатомии и гистопатологии. 2023;12(1):79–87.  
Shoronova AY, Akulinin VA, Stepanov SS, Korzhuk MS, Makarieva LM, et al. Morphofunctional Changes in Neurons, Glial Cells and Synapses in the Sensorimotor Cortex after Severe Traumatic Brain Injury. 2023 Mar;12(1):79–87. (In Russ.) doi: 10.18499/2225-7357-2023-12-1-79-87
15. Alwis DS, Johnstone V, Yan E, Rajan R. Diffuse traumatic brain injury and the sensory brain. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2013 Jun 21;40(7):473–83. doi: 10.1111/1440-1681.12100
16. Arizono M, Inavalli VVGK, Panatier A, Pfeiffer T, Angibaud J, Levet F, et al. Structural basis of astrocytic Ca<sup>2+</sup> signals at tripartite synapses. Nature Communications. 2020 Apr 20;11(1):1906. doi: 10.1038/s41467-020-15648-4
17. Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. The Journal of Comparative Neurology. 2009 Apr 10;513(5):532–41. doi: 10.1002/cne.21974
18. Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic Brain Injury. Medical Clinics of North America. 2020 Mar;104(2):213–38. doi: 10.1016/j.mcna.2019.11.001
19. Cowan M, Petri WA. Microglia: Immune Regulators of Neurodevelopment. Frontiers in Immunology. 2018 Nov 7;9:2576. doi: 10.3389/fimmu.2018.02576
20. Damisah EC, Hill RA, Rai A, Chen F, Rothlin CV, Ghosh S, et al. Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal in vivo. Science Advances. 2020 Jun;6(26):32–9. doi: 10.1126/sciadv.aba3239
21. Finnie J. Animal models of traumatic brain injury: a review. Australian Veterinary Journal. 2001 Sep;79(9):628–33. doi: 10.1111/j.1751-0813.2001.tb10785.x
22. Geuna S, Herrera-Rincon C. Update on stereology for light microscopy. Cell and Tissue Research. 2015 Mar 6;360(1):5–12.
23. Herculano-Houzel S. The Human Brain in numbers: a Linearly scaled-up Primate Brain. Frontiers in Human Neuroscience. 2009 Nov;3(31). doi: 10.3389/neuro.09.031.2009

24. Hilgetag CC, Barbas H. Are there ten times more glia than neurons in the brain? *Brain Structure and Function*. 2009 Feb 7;213(4-5):365–6. doi: 10.1007/s00429-009-0202-z
25. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochemical Research*. 2000;25(9/10):1439–51. doi: 10.1023/a:1007677003387
26. Eyolfson E, Khan A, Mychasiuk R, Lohman AW. Microglia dynamics in adolescent traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2020 Oct 29;17(1):318–26. doi: 10.1186/s12974-020-01994-z
27. Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013;7:3–5. doi: 10.3389/fncel.2013.00003
28. Lent R, Azevedo FAC, Andrade-Moraes CH, Pinto AVO. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *European Journal of Neuroscience*. 2011 Dec 13;35(1):1–9. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07923.x
29. Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, et al. GFAP Is Necessary for the Integrity of CNS White Matter Architecture and Long-Term Maintenance of Myelination. *Neuron*. 1996 Oct;17(4):607–15. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80194-4
30. Mason HD, Johnson AM, Mihelson NA, Mastorakos P, McGavern DB. Glia limitans superficialis oxidation and breakdown promote cortical cell death after repetitive head injury. *JCI Insight*. 2021 Oct 8;6(19):1–13. doi: 10.1172/jci.insight.149229
31. Najem D, Rennie K, Ribecco-Lutkiewicz M, Ly D, Haukenfrers J, Liu Q, et al. Traumatic brain injury: classification, models, and markers. *Biochemistry and Cell Biology*. 2018 Aug;96(4):391–406. doi: 10.1139/bcb-2016-0160
32. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5-th ed. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
33. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013 Sep 1;6(3):126–35. doi: 10.2478/intox-2013-0020
34. Tolias CM, Bullock MR. Critical appraisal of neuroprotection trials in head injury: What have we learned? *Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2004 Jan;1(1):71–9. doi: 10.1602/neurorx.1.1.71
35. Venkatesh K, Srikanth L, Vengamma B, Venkatesh K, Chandrasekhar C, Mouleswara Prasad B, et al. In vitro differentiation of cultured human CD34+ cells into astrocytes. *Neurology India*. 2013;61(4):383–8. doi: 10.4103/0028-3886.117615
36. Zhu H, Dahlström A. Glial fibrillary acidic protein-expressing cells in the neurogenic regions in normal and injured adult brains. *Journal of Neuroscience Research*. 2007;85(12):2783–92. doi: 10.1002/jnr.21257

#### Информация об авторах

Степанов Сергей Степанович – д-р. мед. наук, старший научный сотрудник кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета; serg\_stepanov@mail.ru

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

Шоронова Анастасия Юрьевна – аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета; nastasya1994@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0936-3137>

Акулинин Виктор Александрович – д-р. мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, Омского государственного медицинского университета; ул. Ленина, 12, Омск, 644099, Россия; akulinin@omsk-osma.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

Коржук Михаил Сергеевич – д-р. мед. наук, профессор кафедры и клиники военно-морской хирургии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова; gensurg@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4579-2027>

Макарьева Любовь Михайловна – ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета; lyuba.mamontova.07@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-1133-6541>

Авдеев Дмитрий Борисович – канд. ветеринар. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета; avdeev86@inbox.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>

Степанова Людмила Владимировна – канд. ветеринар. наук, старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета; lw1987@yandex.ru

<https://orcid.org/0009-0003-0446-9041>

Цускман Ирина Геннадиевна – канд. ветеринар. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета; ira.tsuskman@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3667-7905>

#### Information about the authors

Sergei S. Stepanov – Doct. Sci. (Med.), leading researcher of the Department of histology, cytology and embryology of Omsk State Medical University; serg\_stepanov@mail.ru

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

Anastasiya Yu. Shoronova – postgraduate student of the Department of histology, cytology and embryology of Omsk State Medical University; nastasya1994@mail.ru;

<https://orcid.org/0000-0002-0936-3137>

Viktor A. Akulinin – Doct. Sci. (Med.), Prof., head of the Department of histology, cytology and embryology of Omsk State Medical University; ul. Lenina, 12, Omsk, 644099, Russia; akulinin@omsk-osma.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

Mikhail S. Korzhuk – Doct. Sci. (Med.), professor of the Department and Clinic of Naval Surgery of S.M. Kirov Military Medical Academy; gensurg@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4579-2027>

Lyubov' M. Makar'eva – teaching assistant of the Department of histology, cytology and embryology of Omsk State Medical University; lyuba.mamontova.07@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-1133-6541>

Dmitrii B. Avdeev – Cand. Sci. (Vet.), associate professor of the Department of histology, cytology and embryology of Omsk State Medical University; avdeev86@inbox.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>

Lyudmila V. Stepanova – Cand. Sci. (Vet.), senior lecturer of the Department of histology, cytology and embryology of Omsk State Medical University; ov.skryabina@omgau.org

<https://orcid.org/0000-0003-2700-6683>

Irina G. Tsuskman – Cand. Sci. (Vet.), associate professor of the Department of histology, cytology and embryology of Omsk State Medical University; ira.tsuskman@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3667-7905>

Статья поступила в редакцию 1.08.2023; одобрена после рецензирования 8.09.2023; принята к публикации 26.09.2023.

Submitted 1.08.2023; Revised 8.09.2023; Accepted 26.09.2023.