

Морфофункциональная характеристика отека-набухания коры головного мозга белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы без и на фоне применения *L*-лизина эсцината

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

Кафедра неврологии и нейрохирургии; Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии
ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ
Российская Федерация, 644099, Омск, ул. Ленина, д. 12

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

ЦЕЛЬ	Исследование посвящено морфометрической оценке проявлений отека-набухания соматосенсорной коры (ССК) головного мозга белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы (ТЧМТ) на фоне использования в качестве лечебного воздействия <i>L</i> -лизина эсцината.
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	Использована окраска срезов гематоксилином-иозином и методы морфометрии. На тонких (4 мкм) серийных фронтальных срезах ССК изучены нейроны и микрососуды в контроле (интактные животные, $n=5$), через 1 ($n=5$), 3 ($n=5$), 5 ($n=5$), 7 ($n=5$) и 14 ($n=5$) суток после травмы без лечения ($n=25$, группа сравнения) и с лечением ($n=25$, основная группа). На цветных растровых изображениях (объектив $\times 100$) с помощью плагин-фильтра "Find Maxima" определяли зоны максимальной яркости, которые затем анализировали с помощью "Analyze Particles" из программы ImageJ 1.52s. Зоны соответствовали участкам ССК с высокой степенью гидратации нервной ткани — отек-набухание. Статистические гипотезы проверяли с помощью непараметрических критериев.
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	У контрольных животных отмечена низкая степень гидратации нервной ткани ССК (относительная площадь 3–8%). В группе сравнения через 1 и 3 суток после ТЧМТ очаги отека-набухания охватывали до 30% ССК, через 5 суток — до 15%, через 7 суток — до 20%, через 15 — до 18%. Отмечалась значительная гетероморфность и гетерогенность изменений в нейрорпиле, вокруг нейронов и сосудов. В динамике посттравматического периода доля крупных очагов отека-набухания (интра- и перинейрональных, периваскулярных) снижалась. В основной группе через одни сутки после ТЧМТ было статистически значительно меньшее количество очагов отека-набухания и их общая относительная площадь была меньше, чем в группе сравнения. Значительно уменьшался разброс значений данных переменных. Наиболее эффективно <i>L</i> -лизина эсцинат действовал на водный баланс в остром посттравматическом периоде (1-е и 3-и сутки). Препарат «сглаживал» пики проявлений (количество, площадь очагов) отека-набухания: значения изученных морфометрических показателей статистически значительно отличались. Следовательно, морфометрические признаки гидропической дистрофии после ТЧМТ выявлялись в обеих изученных группах на протяжении 15 суток наблюдения.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	После ТЧМТ увеличивалась степень гидратации нервной ткани ССК. <i>L</i> -лизин эсцинат статистически значительно уменьшал проявления гидропической дистрофии. Особенно выраженное влияние препарата на степень гидратации нервной ткани отмечено в раннем посттравматическом периоде.
Ключевые слова:	черепно-мозговая травма; неокортекс; отек-набухание; морфометрия; крысы <i>Wistar</i> , <i>L</i> -лизина эсцинат
Ссылка для цитирования	Кошман И.П., Степанов С.С., Калиничев А.Г., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Шоронова А.Ю. и др. Морфофункциональная характеристика отека-набухания коры головного мозга белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы без и на фоне применения <i>L</i> -лизина эсцината. <i>Журнал им. Н.В. Склифосовского неотложная медицинская помощь</i> . 2020;9(2):251–258. https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-2-251-258
Конфликт интересов	Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов
Благодарность, финансирование	Данная работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» №14 от 15.12.2017 г. и внутреннего гранта ФГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета № 574 от 24.11.2017 г.

ВЧГ — внутричерепная гипертензия
ВЧД — внутричерепное давление
ЗМЯ — зоны максимальной яркости

ОГМ — отек головного мозга
ССК — соматосенсорная кора
ТЧМТ — тяжелая черепно-мозговая травма

ВВЕДЕНИЕ

Тяжелая черепно-мозговая травма (ТЧМТ) является одним из наиболее серьезных видов травм с точки зрения как летальности, так и долгосрочных последствий для выживших. Из общего числа случаев черепно-мозговой травмы в России доля пострадавших с ТЧМТ относительно невелика и составляет около 3,5–7% [1–3]. Однако летальность при данном виде травм колеблется от 41 до 85%, а инвалидизация лиц трудоспособного возраста, перенесших ТЧМТ, остается также крайне высокой [2, 4].

Наиболее важной причиной развития неблагоприятных исходов у пострадавших с ТЧМТ является прогрессирующая внутричерепная гипертензия (ВЧГ), возникающая из-за развития посттравматического отека головного мозга (ОГМ), который является одной из морфологических форм острого повреждения центральной нервной системы, проявляющейся увеличением объема ткани мозга [5]. Он, в свою очередь, приводит к развитию острого дислокационного синдрома, а затем и нарушению жизненно важных функций и возможному смертельному исходу [6–8].

Отек головного мозга при ТЧМТ характеризуется поэтапностью развития, наибольшее патогенетическое значение при котором придается сосудистому компоненту [9, 10]. В остром периоде травмы преобладает вазогенный отек, который развивается из-за повышения проницаемости сосудистой стенки вследствие нарушения функции гематоэнцефалического барьера. При этом жидкость в ткани головного мозга накапливается неравномерно: в белом веществе преимущественно интерстициально, в сером — интрацеллюлярно, главным образом в нейроглии. Затем в связи с переходом жидкости из вне- во внутриклеточное пространство присоединяется цитотоксический ОГМ [11, 7, 12].

В настоящее время существуют как хирургические, так и консервативные методы коррекции ВЧГ, целью которых является уменьшение внутричерепных объемов и объема цереброспинальной жидкости [13]. При этом актуальным остается поиск препарата, который может воздействовать непосредственно на ОГМ, обеспечивая защиту нейронов и стабилизацию микроциркуляторного сосудистого русла головного мозга [9].

В связи с этим обращает на себя внимание лекарственный препарат *L*-лизина эсцинат. Данный препарат способствует нормализации сосудистой проницаемости, тем самым оказывая антиэкссудативное и противовоспалительное действие [14]. Имеются клинические данные эффективности *L*-лизина эсцината в уменьшении отека-набухания головного мозга, что в свою очередь снижает внутричерепное давление (ВЧД) и устраняет дислокацию структур мозга [9, 8].

Экспериментальное моделирование ТЧМТ позволяет провести количественное морфометрическое изучение динамики проявлений отека-набухания нервной ткани, что имеет особую значимость для оценки эффективности методов лечения [15]. В этой связи влияние применения *L*-лизина эсцината в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы с помощью гистологических и морфометрических методов не изучено. Нет данных, подтверждающих эффективность препарата в динамике постишемического периода.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрено этическим комитетом университета (протокол № 107 от 2 октября 2018 г.). В качестве экспериментальных животных использовали 55 аутбредных половозрелых самцов крыс стока *Wistar* массой 270–350 г (ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»). Животных содержали в стандартных лабораторных условиях при своевременном приеме корма и питьевой воды. 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 соматосенсорной коры (ССК) головного мозга в динамике посттравматического периода было проведено моделирование ТЧМТ на фоне умеренной седации. Использовали раствор препарата *Zoletil* 100 (в дозировке 5–7 единиц).

В течение 12 часов до ТЧМТ животные не получали пищу, но в воде их не ограничивали. Через 5 минут после введения *Zoletil* 100 и наступления расслабления скелетной мускулатуры крысу фиксировали на животе на деревянном столике за передние и задние лапы. Под нижнюю челюсть подкладывали синтепоновую подушку размером 5,0х5,0 см и высотой 2 см с целью исключения перелома нижней челюсти. Фиксированное животное помещали на платформу рельсовой стойки высотой 1,5 метра. Груз массой 200–250 грамм (рассчитывался соответственно массе животных 270–320 г) размещался над головой крысы на высоте 50 см так, чтобы удар приходился на теменно-затылочную область.

После ТЧМТ все животные ($n=50$) случайным образом (генератор чисел) были разделены на две группы. В основной группе ($n=25$) сразу после нанесения травмы и в последующий один раз в сутки в боковую вену хвоста крысы инсулиновым шприцом вводили раствор системного ангиопротектора (*L*-лизина эсцинат) в разведении 0,1 мл препарата в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl (дозировка рассчитывалась в соответствии со средней массой крысы 295 ± 25 г). Животным группы сравнения ($n=25$) препарат не вводили. Контролем служили интактные крысы ($n=5$).

Вывод животных основной группы и группы сравнения из эксперимента осуществляли через 1, 3, 5, 7 и 14 суток после травмы путем кровопускания с последующей перфузией фиксирующего раствора. Манипуляции проводили под наркозом (*Zoletil* 100). После торокотомии через прокол в левый желудочек вводили 100–125 мл раствора 0,9% NaCl и Фрагмина (5000 единиц), который оттекал через разрез правого предсердия. Затем рану в предсердии зажимали, а в левый желудочек вводили 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). После этого выполняли декапитацию и извлечение мозга из полости черепа. Извлеченный мозг хранили при температуре 3–5°C в аналогичном фиксаторе. Далее

материал закладывали в гомогенизированный парафин (*HISTOMIX*®) с помощью автомата для гистологической проводки карусельного типа «STP 120». Серийные фронтальные срезы толщиной 4 мкм выполняли на уровне ССК (-) 2,40 — (-) 3,36 мм от *Bregma* [16]. Использовали санный микротом HM 450 (*Thermo*) с электронным контролем толщины среза. Препараты готовили из каждого 10-го серийного среза (5 — на случай, 25 — на срок): окрашивали по Нисслию, а также гематоксилином и эозином.

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 программе *Photoshop CC*. Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы *ImageJ 1.52s*. Использовали цветные изображения, представленные с каждого среза в виде стеков (поле зрения: 50x50 мкм, или 2500 мкм²). 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 полученных в результате работы этого фильтра масках изображений определяли (“*Analyze Particles*”) относительную площадь (*S*, %), численную плотность (*N*, на 2500 мкм²) и площадь одной зоны максимальной яркости (*S_{max}*, мкм²). Неравномерность распределения зон максимальной яркости (ЗМЯ) оценивали с помощью алгоритма водораздела “*Segmented Particles*”, примененного к значениям яркости изображения.

Формирование выборок (рандомизация) полей зрения (*n*=100, на каждый срок) для каждой экспериментальной группы проводили из полученных массивов данных с помощью генератора случайных чисел в программе *Statistica 8.0*. Это позволило избежать систематических ошибок при проверке статистических гипотез. Характер распределения вариационных рядов оценивали с помощью тестов *Lilliefors* и *Shapiro-Wilk* (*Statistica 8.0*) и построения квантильных графиков (среда *R*). Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями Манна-Уитни, *ANOVA* (однофакторный дисперсионный анализ) и Краскела-Уоллиса (*StatSoft Statistica 8.0*). Количественные данные в работе представлены как медиана (50%-й квартиль — мера центральной тенденции) и 25–75%-е квартили, диапазоны с выбросами, без выбросов — меры разброса изученных величин. Медиана является не зависящей от выбросов робастной характеристикой и наиболее подходит для настоящего исследования [17]. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при *p*≤0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В норме (группа контроля) на срезах ССК, окрашенных гематоксилином-иозином, нейропилль был представлен однородным субстратом без структурных проявлений отека-набухания его составляющих (дендриты, синапсы, отростки астроцитов), преобладали типичные нормохромные нейроны без признаков гидрической дистрофии (рис. 1). ЗМЯ пикселей

изображения (максимальная гидратация и свободная вода) соответствовали в основном просветам сосудов (рис. 1 А, С) и редко встречались в периваскулярных пространствах (рис. 1 В).

Все это свидетельствовало о низкой степени гидратации (способность воды к химической ассоциации с гидрофильными веществами — набухание) нервной ткани ССК и о практически полном отсутствии свободной воды (механическая форма связи с окружающими структурами — отек) в норме. На растровых изображениях препаратов фиксированной в формалине и окрашенной гематоксилином и эозином нервной ткани степень гидратации ее компонентов определялась яркостью пикселей (от 0 до 255). Максимального значения (230–245) достигали участки, содержащие свободную воду, в других участках степень гидратации (химическая связь) нейропиля по яркости пикселей видоизменялась от 190 до 230.

После ТЧМТ появлялись типичные структурные признаки отека-набухания нейронов, дендритов, нейропиля, отека перичеселлюлярных и периваскулярных отростков астроцитов (рис. 2). Это свидетельствовало об изменениях силы связывания воды структурами нервной ткани. Увеличивались степень гидратации молекул нейронов и, особенно, нейропиля, а также количество свободной воды.

Оценку изменения содержания связанной и свободной воды проводили по количеству ярких пикселей на цветных изображениях, выявленных с помощью плагин-фильтра “*Find Maxima*” в программе *ImageJ 1.52S* (рис. 3).

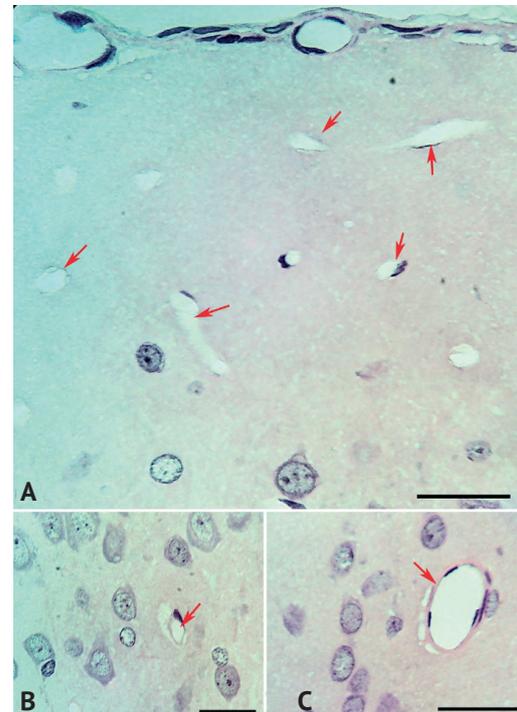


Рис. 1. Микрофотографии слоя I (А) и II (В, С) соматосенсорная кора головного мозга контрольной белой крысы: зоны максимальной яркости соответствуют просветам сосудов (стрелки), отсутствие проявлений отека-набухания. Окраска гематоксилином-иозином; объектив x40; шкала — 25 мкм
Fig. 1. Layers I (A) and II (B, C) Somatosensory cortex of a white rat brain: maximum brightness areas correspond to lumen (arrows), signs of edema-swelling are absent. Hematoxylin-eosin stain; x40 magn; scale — 25 microns

У контрольных животных количество ЗМЯ в поле зрения (2500 мкм²) ССК варьировалось в пределах 20–100 (*Min-Max*), то есть 8 000–40 000 на 1 мм² среза ССК (рис. 4 А). При этом относительная площадь всех ЗМЯ не превышала 8% (рис. 4 В), а площадь одной ЗМЯ варьировалась от 1 до 4,5 мкм² (рис. 4 С). Крупные ЗМЯ соответствовали просветам капилляров (рис. 1 А, С). Артериолы и венулы нами не учитывались.

В остром посттравматическом периоде (1-е и 3-и сутки) после ТЧМТ отмечались выраженные проявления отека-набухания (рис. 2). В результате изменялась структура вариационных рядов изученных переменных: увеличивались диапазоны с выбросами и количество экстремальных значений. Особенно наглядно это было для относительной площади всех ЗМЯ и площади одного ЗМЯ (рис. 4 В, С; 5). На точечных графиках пространственного распределения изученных переменных относительно друг друга видно, что скопления значений в контроле располагались автономно от такового через одни сутки после ишемии. Пространственные распределения переменных в группе без лечения и с лечением значительно отличались выбросами значений (рис. 4 D–F). В основной группе распределение значений переменных было более компактным и приближенным к контролю (рис. 4 D–F). Кроме того, распределение вариационных рядов через одни сутки после травмы в группе сравнения существенно отличалось от нормального по данным тестов ($p < 0,01$), что и подтверждалось при построении квантильных графиков. Следовательно, важными показателями при оценке влияния препарата на морфометрические структурные проявления отека-набухания после ТЧМТ были диапазон без выбросов (*Max-Min*), с выбросами и крайние (экстремальные) точки вариационного ряда. То есть при сравнении близких значений центральных тенденций (медиана, среднее), ввиду их неявных изменений, целесообразно более полно использовать показатели вариации переменных.

В группе без лечения и с лечением все изученные переменные ($N, S_{отн.}, S_{max}$) через 1, 3, 5, 7 и 14 суток после ТЧМТ статистически значимо отличались от таковых в группе контроля ($p < 0,001$; критерий Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова).

Через одни сутки после ТЧМТ в группе сравнения количество ЗМЯ в единице поля зрения увеличивалось в 4 раза по сравнению с контролем (рис. 2 А), при этом их общая относительная площадь варьировалась от 10 до 28%, а площадь основной массы одной ЗМЯ — от

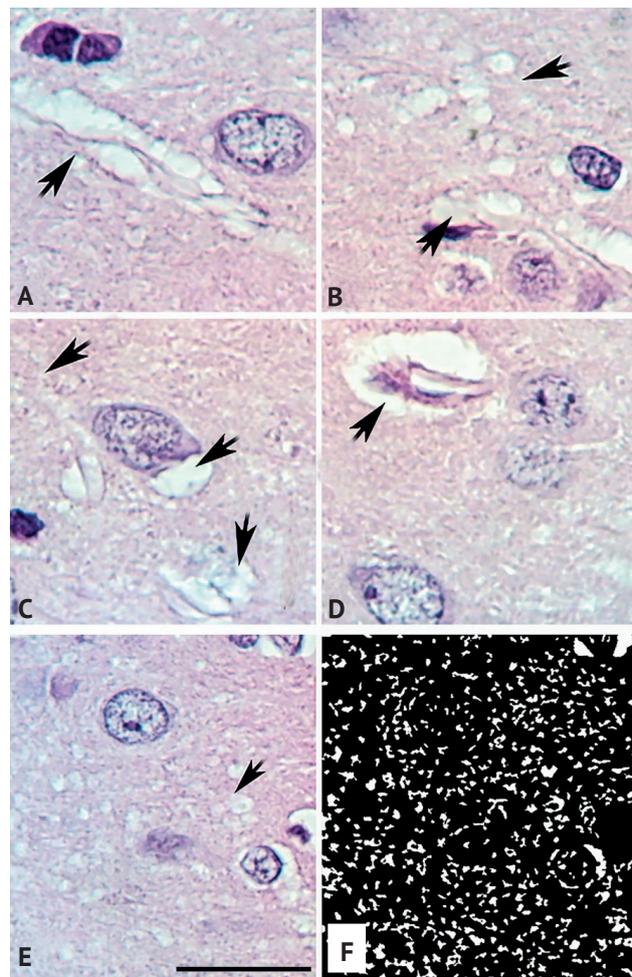


Рис. 2. Микрофотографии слоя III соматосенсорной коры головного мозга белой крысы через одни сутки после черепно-мозговой травмы: А–Е — произвольно взятые поля зрения с различными проявлениями и локализацией зон отека-набухания нервной ткани, F — бинарное изображение поля «D» (белое — зоны максимальной яркости — отека-набухания, черное — окрашенные гематоксилином-иозином структуры с низкой степенью гидратации). Окраска гематоксилином-иозином; объектив x100; шкала — 25 мкм
 Fig. 2. Somatosensory cerebral cortex of a white rat after traumatic brain injury, layer III, day 1: A–E — randomly selected field of view and various manifestations of localized edema-swelling areas of the nerve tissue, F — binary field picture “D” (white — areas of maximum brightness — edema-swelling, black — hematoxylin-eosin-stained structures with a low degree of hydration). Hematoxylin-eosin stain; x100 lens; scale — 25 microns

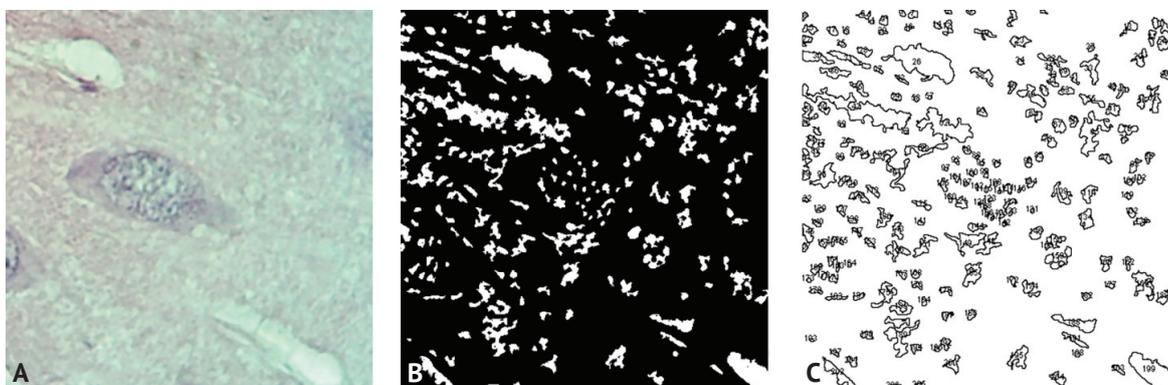


Рис. 3. Микрофотография исходного изображения и его трансформация в ходе морфометрического исследования: А — стандартная случайно выделенная область интересов (50x50 мкм); В, С — результаты применения фильтра “Find Maxima” и плагина “Analyze Particles”. Зоны максимальной яркости имеют сложную форму, пронумерованы
 Fig. 3. The main stages of the technology for morphometric research of the zone of maximum image brightness : A — standard randomly selected area of interest (50x50 microns); B, C — the results of applying the filter “Find Maxima” and the plug-in “Analyze Particles”. Areas of brightness have a complex shape, numbered

1 до 6 мкм² (рис. 6). Подобные размеры в нейрориле соответствовали срезам мелких и средних отростков астроцитов, синаптических терминалей и дендритов. Это свидетельствовало о том, что именно эти структуры в остром периоде подвергались максимальным гидропическим изменениям. Более крупные ЗМЯ — перичеселлюлярный и периваскулярный отек — представлены совокупностью конгломератов соответствующих астроцитарных отростков.

Через 3, 5, 7 и 14 суток после ТЧМТ значения медианы и 25–75%-х квартилей изученных переменных в группе сравнения оставались на уровне первых суток. Однако их максимальные и экстремальные значения

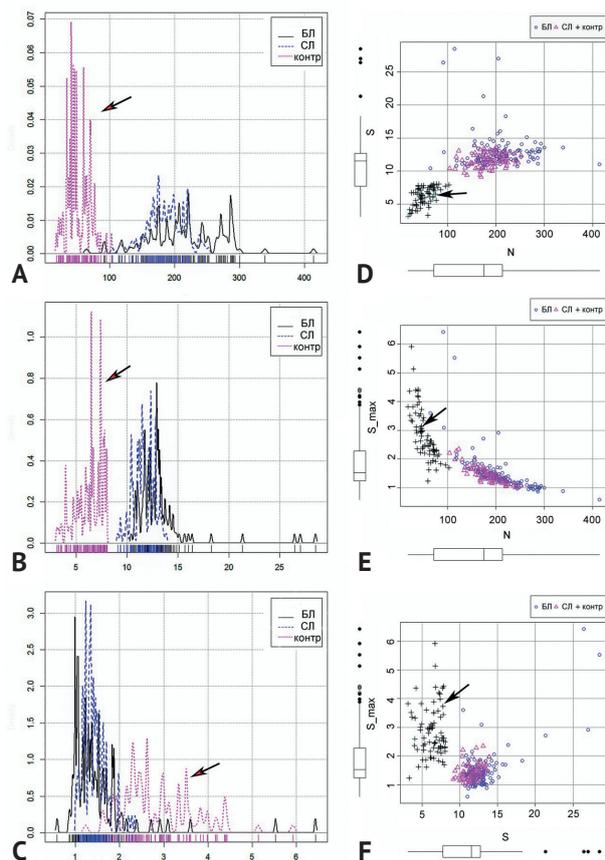


Рис. 4. Гистограммы и точечные графики частотного распределения полей зрения в контроле, в основной (СЛ — с лечением) и группе сравнения (БЛ — без лечения) через одни сутки после ТЧМТ по количеству зон максимальной яркости (А), относительной площади всех зон максимальной яркости (В), площади одной зоны максимальной яркости (С) и пространственное распределение этих переменных относительно друг друга (D–F). N — количество зон максимальной яркости в поле зрения (на 2500 мкм²), S — относительная площадь зон максимальной яркости (%), S_{max} — площадь одной зоны максимальной яркости (мкм²). Краевые «ящики с усами» — значения независимых переменных: медиана (50%), 25%–75%-е квартили, диапазон без выбросов и выбросы

Fig. 4. Histograms of the frequency distribution of the visual fields in the control, in the main group and the comparison group in a day after the STBI by the number of maximum brightness areas (A), the relative area of all areas of maximum brightness (B), the area of one zone of maximum brightness (C) and the spatial distribution of these variables relative to each other (D–F). N is the number of zones of maximum brightness in the field of view (by 2500 μm^2), S is the relative area of the zones of maximum brightness (%), S_{max} is the area of one zone of maximum brightness (μm^2). Boundary “box and whisker plots” — values of the independent variables: median (50%), 25%–75% th quartiles, non-outlier range and outliers

через 5 суток уменьшались, а особенно наглядно это проявлялось для относительной площади ЗМЯ (рис. 6). Вероятно, это свидетельствовало о снижении степени гидратации нервной ткани ССК через 5 суток после травмы. Переменные, отражающие степень гидратации нервной ткани ССК, не достигали контрольных значений в течение всего периода наблюдения. Через 14 суток относительная площадь ЗМЯ варьировалась в пределах от 9 до 18%. То есть 9–18% площади/объема ткани ССК оставалось в состоянии повышенной гидратации, с зонами периваскулярного и перичеселлюлярного отека, однако доля крупных очагов отека-набухания (интра- и перинейрональных, периваскулярных) при этом снижалась, меньше оставалось сдавленных отеком сосудов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, после ТЧМТ в ССК происходило значительное увеличение степени гидратации нервной ткани (набухание), при котором часть химически связанной с макромолекулами воды переходила в состояние свободной формы (отек). Этот процесс сопровождался мелкоочаговыми изменениями тинкториальных свойств перикарионов, отростков нейронов, синаптических терминалей и астроцитов. В результате появилась возможность с помощью фильтра “Find Maxima” (из программы ImageJ 1.52s) на цветных изображениях выявить ЗМЯ, соответствующие зонам максимальной гидратации нервной ткани, и морфометрически их оценить (плагин “Analyze Particles”). Установлено, что в течение 14 суток после ТЧМТ изученные переменные (количество и относительная площадь ЗМЯ) в сравниваемых группах статистически значимо превышали контрольное значение. То есть после ТЧМТ на протяжении всего периода наблюдения сохранялся высокий общий уровень гидратации нервной ткани ССК.

Использование *L*-лизина эсцината оказывало статистически значимое влияние на изученные морфометрические показатели. Через одни сутки после ТЧМТ в основной группе было меньшее количество ЗМЯ и их общая относительная площадь. При этом

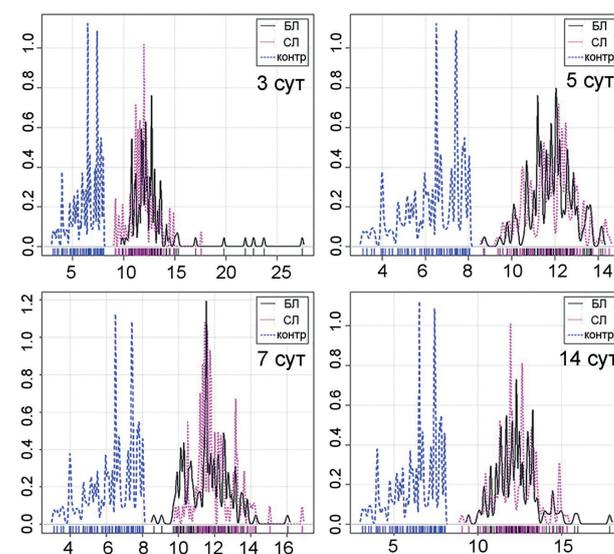


Рис. 5. Гистограммы изменения плотности распределения (ось ординаты) полей зрения по величине относительной площади (%) зон максимальной яркости (ось абсциссы)
Fig. 5. The dynamics of changes in the distribution density (ordinate axis) of the visual fields according to the value of the relative area (%) of the zones of maximum brightness (abscissa axis)

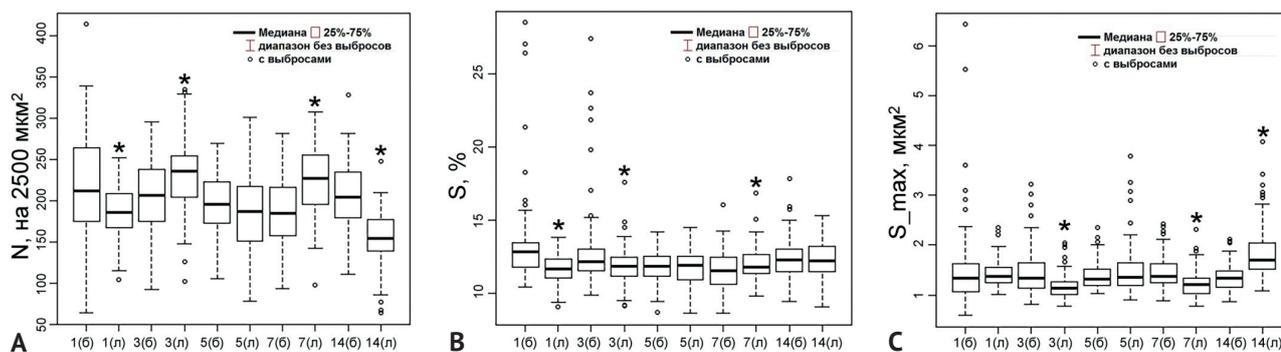


Рис. 6. Диаграммы переменных, отражающих степень гидратации нервной ткани соматосенсорной коры в динамике посттравматического периода (1–14-е сутки) в группах без лечения (б) и с лечением (л): А — количество (N) зон максимальной яркости в поле зрения; В — относительная площадь (S) всех зон максимальной яркости; С — площадь одной зоны максимальной яркости (S_{max}); * — различия между группами статистически значимы ($p < 0,001$, критерий Колмогорова–Смирнова). Материал представлен как медиана (50%), 25–75%-е квартили, диапазон без выбросов и с выбросами Fig. 6. Morphometric characteristics of changes in the degree of somatosensory nerve tissue hydration in the post traumatic (day 1–14) in group without treatment and with treatment: А — number of zones of maximum brightness in the field of view, В — relative area of all the zones of maximum brightness, С — the area of one zone of maximum brightness; * — differences between groups are statistically significant ($p < 0,001$, Kolmogorov–Smirnov test). The material is presented as the median (50%), 25–75% th quartile, the non-outlier range and outlier range

сужался разброс значений переменных. Подобная тенденция сохранялась для относительной площади ЗМЯ и через 3 суток. Через 5 и 14 суток статистически значимых различий медианы этого показателя выявлено не было. Однако при лечении относительная площадь ЗМЯ в разных полях зрения варьировалась от 9 до 15%, а без лечения — от 9 до 20% (рис. 6 Б).

Полученные данные свидетельствовали о том, что L -лизина эсцинат наиболее эффективно влиял на водный баланс в остром посттравматическом периоде (1-е и 3-и сутки), способствуя уменьшению количества очагов отека-набухания и их общую относительную площадь/объем. Это накладывалось на естественный процесс снижения гидратации нервной ткани ССК после травмы. Однако и при использовании L -лизина эсцината сохранялась высокая степень гидратации нейронов, астроцитов и нейропиля. Препарат лишь «сглаживал» экстремальные пики (скачки) количества и площади очагов отека-набухания в остром периоде после травмы. При этом сам патобиохимический процесс гидропической дистрофии развивался в обеих изученных группах.

ЛИТЕРАТУРА

- Аханов Г.Ж., Дюсембеков Е.К., Нурбакыт А.Н. Клинико-эпидемиологические аспекты черепно-мозговой травмы. *Нейрохирургия и неврология Казахстана*. 2017;2(47):65–71.
- Лихтерман Л.Б. *Черепно-мозговая травма. Диагностика и лечение*. Москва; ГЭОТАР-Медиа; 2014.
- Крылов В.В., Коновалов А.Н., Дашьян В.Г., Кондаков Е.Н., Тяньшин С.В., Горельшев С.К. и др. Состояние нейрохирургической службы Российской Федерации. *Журнал Вопросы нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко*. 2017;1(81):5–12.
- Hackenberg K, Unterberg A. Schädel-Hirn-Trauma [Traumatic brain injury]. *Nervenarzt*. 2016; 87(2):205–216. [in German] PMID: 26810405. <https://doi.org/10.1007/s00115-015-0051-3>
- 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>
- Крылов В.В., Петриков С.С., Солодов А.А. *Внутричерепная гипертензия*. Москва; БИНОМ; 2016.
- 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 эсцината 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>
- 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>
- 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 эсцината при заболеваниях центральной нервной системы. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2011;3(4):99–104.
- Бадалов В.И., Шевелев П.Ю., Рева В.А., Семенов Е.А., Аджиева З.Н., Михайловская Е.М. и др. Разработка экспериментальной модели тяжелой черепно-мозговой травмы. *Военно-медицинский журнал*. 2018;339(7):15–21.

ВЫВОДЫ

1. После тяжелой черепно-мозговой травмы увеличивалась степень гидратации нервной ткани соматосенсорной коры. Через одни сутки после травмы относительная площадь зон отека-набухания в группе без лечения варьировалась от 10 до 30% поля зрения соматосенсорной коры.

2. Введение L -лизина эсцината приводило к статистически значимому уменьшению проявлений гидропической дистрофии. Максимально выраженное влияние препарата на степень гидратации нервной ткани соматосенсорной коры отмечено в раннем посттравматическом периоде: через одни сутки относительная площадь зон отека-набухания в группе с лечением не превышала 15%. Отмечалось также снижение численной плотности очагов отека-набухания (особенно это касалось выбросов): максимальное значение без лечения достигало 350, а с лечением — 250 на 2500 мкм². Однако, несмотря на наличие эффекта препарата, гидропические изменения соматосенсорной коры после тяжелой черепно-мозговой травмы сохранялись в течение всего наблюдения.

16. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. The New coronal set. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
17. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. 2-е изд. Санкт-Петербург: Издательство Питер; 2003.

REFERENCES

- Akhanov GZh, Dyusembekov EK, Nurbakyt AN. Clinical and epidemiological aspects of an isolated craniocerebral trauma. *Neurosurgery and Neurology of Kazakhstan*. 2017;2(47):65–71. (In Russ).
- Likhterman LB. *Cherepno-mozgovaya travma. Diagnostika i lechenie*. Moscow; GEOTAR-Media Publ.; 2014. (In Russ).
- Krylov VV, Kononov AN, Dash'yan VG, Kondakov EN, Tanyashin SV, Gorelyshev SK, et al. Neurosurgery in Russian Federation. *Burdenko's Journal of Neurosurgery*. 2017; 1(81):5–12. (In Russ).
- Hackenberg K, Unterberg A. Schädel-Hirn-Trauma [Traumatic brain injury]. *Nervenarzt*. 2016; 87(2):203–216. (in German). PMID: 26810405. PMID: 26810405 <https://doi.org/10.1007/s00115-015-0051-3>
- Zadvornov AA, Golomidov AV, Grigor'ev EV. Clinical pathophysiology of cerebral edema (part 2). *Messenger of Anesthesiology and Resuscitation*. 2017;14(4):52–60. (In Russ).
- Krylov VV, Petrikov SS, Solodov AA. *Vnutricherepnaya gipertenziya*. Moscow: BINOM Publ.; 2016. (In Russ).
- Latysheva VY, Kurman VI, Tsukanov AN, Usova NN, Galinovskaya NV, Olizarovich MV. *Otek golovnogo mozga: etiopatogenez, klinika, diagnostika, lechenie*. Gomel'; 2016. (In Russ).
- Petrikov SS, Solodov AA, Badygov SA, Mekhia Mekhia ED, Krylov VV. The effect of L-lysine of escinate on intracranial pressure in patients with severe traumatic brain injury who are in critical condition. *Russian Sklifosovsky Journal Emergency Medical Care*. 2016; 2:31–36. (In Russ).
- Mirzabaev MZh, Djusembekov EK, Aliev MA. Dynamics and correction ways of intracranial pressure in patients with heavy brain injury. *Herald of Almaty State Institute of Advanced 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>
- Zadvornov AA, Golomidov AV, Grigor'ev 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>
- 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>
- Parfenov VA. The use of L-lysine of escinate in diseases of the central nervous system. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2011;3(4):99–104. (In Russ).
- Badalov VI, Shevelev PYu, Reva VA, Semenov EA, Adzhieva ZN, Mikhailovskaya EM, et al. Development of an experimental model of severe traumatic brain injury. *Voенно-медицинский журнал*. 2018; 339(7):15–21. (In Russ).
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. The New coronal set. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
- Borovikov V. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. 2nd ed. Saint Petersburg: Piter Publ.; 2003. (In Russ).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кошман Игорь Петрович

очный аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии ФГБОУ ВО ОГМУ МЗ РФ; <https://orcid.org/0000-0002-9763-2981>, koshman.ip@gmail.com;

30%: экспериментальный, анатомический, гистологический, иммуногистохимический, морфометрический и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа

Степанов Сергей Степанович

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ОГМУ МЗ РФ; <https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>, serg_stepanov@mail.ru;

20%: экспериментальный, анатомический, гистологический, иммуногистохимический, морфометрический и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа

Шоронова Анастасия Юрьевна

ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ОГМУ МЗ РФ; <https://orcid.org/0000-0002-0936-3137>, nastasya1994@mail.ru;

15%: экспериментальный, анатомический, гистологический, иммуногистохимический, морфометрический и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа

Калиничев Алексей Геннадьевич

доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии ФГБОУ ВО ОГМУ МЗ РФ; <https://orcid.org/0000-0002-2534-6329>, akalinichev59@gmail.com;

10%: экспериментальный, анатомический, гистологический, иммуногистохимический, морфометрический и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа

Акулинин Виктор Александрович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ОГМУ МЗ РФ; <https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>, akulinin@omsk-osma.ru;

10%: экспериментальный, анатомический, гистологический, иммуногистохимический, морфометрический и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа

Авдеев Дмитрий Борисович

кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ОГМУ МЗ РФ; <https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>, avdeev86@inbox.ru;

10%: экспериментальный, анатомический, гистологический, иммуногистохимический, морфометрический и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа

Сергеев Владислав Игоревич

студент 3-го курса стоматологического факультета ФГБОУ ВО ОГМУ МЗ РФ; <https://orcid.org/0000-0002-5878-7403>, vlad300399@mail.ru;

5%: экспериментальный, анатомический, гистологический, иммуногистохимический, морфометрический и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа

Morphofunctional Characteristic of Edema-Swelling of the Cerebral Cortex of White Rats After Severe Traumatic Brain Injury Without the Use of L-Lysine Escinate and Against the Background of Its Use

I.P. Koshman, S.S. Stepanov, A.Y. Shoronova, A.G. Kalinichev, V.A. Akulinin, D.B. Avdeyev*, V.I. Sergeyev

Department of Neurology and Neurosurgery; Department of Histology, Cytology and Embryology
Omsk State Medical University
12 Lenina St., Omsk 644099, 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

AIM OF STUDY The study is devoted to a morphometric assessment of the manifestations of edema-swelling of the somatosensory cortex (SSC) of the brain of white rats after severe traumatic brain injury (TBI) without using L-lysine escinate and when using it as a therapeutic effect.

MATERIAL AND METHODS We stained sections with hematoxylin-eosin and performed morphometric methods. On thin (4 µm) serial frontal sections of SSC, neurons and microvessels in the control (intact animals, n=5), 3 (n=5), 5 (n=5), 7 (n=5) and 14 (n=5) days after injury without treatment (n=25, comparison group) and with treatment (n=25, main group). In color raster images (lens x100), using the plug-in filter "Find Maxima", maximum brightness areas (MBA) were determined, which were then analyzed using the "Analyze Particles" program from ImageJ 1.52 s. MBA corresponded to SSC sites with a high degree of hydration of nerve tissue – edema-swelling. Statistical hypotheses were tested using nonparametric criteria.

RESULTS AND DISCUSSION In control animals, a low degree of hydration of SSC tissue was noted (relative area 3–8%). In the comparison group, 1 and 3 days after STBI, foci of edema-swelling covered up to 30% of SSC, in 5 days – up to 15%, in 7 days – up to 20%, in 15 – up to 18%. Significant heteromorphism and heterogeneity of changes in the neuropil around neurons and blood vessels was noted. In the dynamics of the post-traumatic period, the proportion of large foci of edema-swelling (intra- and perineuronal, perivascular) decreased. In the main group, one day after STBI, there was a statistically significantly smaller number of foci of edema-swelling and their total relative area. The values range of these variables significantly decreased. L-lysine escinate affected the water balance most effectively in the acute post-traumatic period (day 1 and 3). The drug "smoothed out" the manifestation peaks (number, focal area) of edema-swelling: the values of the studied morphometric indicators were statistically significantly different. Consequently, morphometric signs of hydropic dystrophy after STBI were detected in both studied groups during the 15 days of observation.

CONCLUSION The degree of SSC nervous tissue hydration increased after STBI. L-lysine escinate statistically significantly reduced manifestations of hydropic dystrophy. The drug significantly affected the degree of hydration of neural tissue observed in the early post-traumatic period.

Keywords: traumatic brain injury; neocortex; edema-swelling; morphometry; Wistar rats, L-lysine escinate

For citation Koshman IP, Stepanov SS, Shoronova AY, Kalinichev AG, Akulinin VA, Avdeyev DB, et al. Morphofunctional Characteristic of Edema-Swelling of the Cerebral Cortex of White Rats After Severe Traumatic Brain Injury Without the Use of L-Lysine Escinate and Against the Background of Its Use. *Russian Sklifosovsky Journal of Emergency Medical Care*. 2020;9(2):251–258. DOI: 10.23934/2223-9022-2020-9-2-251-258 (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

Affiliations

- Igor P. Koshman Full-time graduate student of the Department of Neurology and Neurosurgery, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Omsk State Medical University; <https://orcid.org/0000-0002-9763-2981>, koshman.ip@gmail.com;
30%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as observation methods, description and analysis
- Sergey S. Stepanov Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, Department of Histology, Cytology and Embryology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Omsk State Medical University; <https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>, serg_stepanov@mail.ru;
20%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as observation methods, description and analysis
- Anastasia Yu. Shoronova Assistant, Department of Histology, Cytology and Embryology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Omsk State Medical University; <https://orcid.org/0000-0002-0936-3137>, nastasya1994@mail.ru;
15%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as observation methods, description and analysis
- Aleksey G. Kalinichev Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Neurology and Neurosurgery Omsk State Medical University; <https://orcid.org/0000-0002-2534-6329>, akalinichev59@gmail.com;
10%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as observation methods, description and analysis
- Viktor A. Akulinin Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University; <https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>, akulinin@omsk-osma.ru;
10%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as observation methods, description and analysis
- Dmitry B. Avdeyev Candidate of Veterinary Sciences, Senior Lecturer, Department of Histology, Cytology and Embryology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Omsk State Medical University; <https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>, avdeev86@inbox.ru;
10%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as observation methods, description and analysis
- Vladislav I. Sergeyev 3rd year student of the Faculty of Dentistry, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Omsk State Medical University; <https://orcid.org/0000-0002-5878-7403>, vlad_300399@mail.ru;
5%: experimental, anatomical, histological, immunohistochemical, morphometric and information-mathematical methods, as well as observation methods, description and analysis