

К.В. Мізякіна
Л.А. Дзяк

Дніпровський державний
медичний університет
Дніпро, Україна

Надійшла: 28.04.2024
Прийнята: 19.05.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.2.55-64>

УДК 591.481.1-001:57.012.4

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФРОНТАЛЬНОЇ КОРИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ З РІЗНИМИ НЕЙРОКОГ- НІТИВНИМИ РОЗЛАДАМИ ПІСЛЯ ТЯЖ- КОЇ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВОЇ ТРАВМИ

Mizyakina K.V.  , Dzyak L.A.  Morphological characteristics of the frontal cerebral cortex of rats with various neurocognitive disorders after severe traumatic brain injury.

Dnipro state medical university, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Information about the sensitivity of different neurons and neuroglia cells to injury and their ability to recover depending on the location of the damage and the nature of hemomicrocirculation changes in the post-traumatic period require significant clarification. **The aim.** Determination of tissue and cellular posttraumatic changes in the structure of the precentral gyrus of the brain frontal lobe of rats with various neurocognitive disorders at different times after severe TBI. **Methods.** A "shock acceleration model" was used to reproduce severe TBI in rats. According to the results of neurological tests, the rats were divided into three groups: 1) the first – animals after TBI with neurocognitive disorders and memory disorders; 1) the second – animals after TBI with neurocognitive disorders without memory disorders; 3) comparison group – animals after TBI without neurocognitive disorders. A histological, morphometric and immunohistochemical study of the precentral gyrus of the frontal lobe was carried out using the markers β -tubulin, Synaptophysin, GAP43, NCAM1, N-cadherin, GFAP. **Results and conclusion.** 20 and 40 days after injury, neurons with limited synthetic activity and signs of neurodestruction are stably preserved in the cortex of rats with neurocognitive disorders, regardless of the degree of memory disorders, while in animals without cognitive deficits, damaged neurocytes in the pyramidal layers are not detected. 10 days after severe TBI, significant accumulation of protoplasmic astrocytes in pericapillary spaces is observed in the frontal cortex of animals of all groups, which is often associated with foci of edema and increased mitotic activity of gliocytes. At the same time, large areas of the neuropil with a low density of fibrous astrocytes are formed. After 20 and 40 days of the post-traumatic period, in animals with neurocognitive disorders, foci of astrocytic deficiency persist, in rats of the comparison group, they are very rare. 10 days after severe TBI in animals with neurocognitive disorders, a significant increase in the number of newly formed hemocapillaries with a typical structure is observed. A large number of densely packed protoplasmic astrocytes is found on the surface of damaged capillaries. 40 days after the injury, the number of damaged microvessels with layers of astrocytes on the outer surface significantly decreases. In contrast to these changes, in animals without neurocognitive deficits, the number of damaged microvessels surrounded by astrocytic conglomerates is significantly lower. In animals without neurocognitive disorders, 20 and 40 days after the injury, there is a noticeable reduction in microcirculatory damage.

Key words: traumatic brain injury, rats, neurocognitive disorders, memory impairment, neurodestruction, frontal cortex, morphometry, immunohistochemical markers.

Citation:

Mizyakina KV, Dzyak LA. [Morphological characteristics of the frontal cerebral cortex of rats with various neurocognitive disorders after severe traumatic brain injury]. Morphologia. 2024;18(2):55-64. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.2.55-64>

 Mizyakina E.V. 0000-0003-2130-6132

 Dzyak L.A. 0000-0002-2827-3663

 mizyakina.e@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Серед причин, що визначають ступінь інвалідизації після травматичного ушкодження головного мозку (ТУГМ), особливе значення мають розлади вищих психічних функцій. Доведено, що патогномонічність психопатологічних наслідків

мало залежить від тяжкості травми, глибини неврологічних розладів, особливостей макроструктурних пошкоджень мозку та може формуватися як у гострому, так і у віддаленому періоді черепно-мозкової травми (ЧМТ). Широкий спектр нейро-

когнітивних розладів формується у більшості хворих з ТУГМ, причому у 3-10% постраждалих, які мають в анамнезі тяжку травму (ТЧМТ), розвивається деменція [1, 2].

У вирішенні численних питань, пов'язаних із лікуванням та реабілітацією пацієнтів з ТУГМ, особливий інтерес представляє вивчення патоморфологічних механізмів, які визначають характер формування та динаміки нейрокогнітивних порушень у різні терміни після травми. Показано, що після ЧМТ запальна реакція, токсичність глутамату та інших медіаторів, утворення вільних радикалів, іонний дисбаланс і активація апоптотичних процесів спричиняють масовану вторинну загибель нейронів, тим часом призводячи до набряку мозку, пошкодження аксонів і аноксії, деструкції гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), посилення запалення, окислювального стресу та нейродегенерації, що обумовлює поглиблення когнітивних порушень [3-5]. Основною причиною нейрокогнітивних порушень є пошкодження нервових клітин, проте також активуються астроцити, олігодендроцити та мікроглія. Активація астроцитів викликає гіперплазію гліального рубця після ЧМТ та низку інших перебудов макроглії [6]. Пошкоджені олігодендроцити можуть впливати на мієлін, спричиняючи таким чином дисфункцію нервової провідності [7]. Поряд з цим активовані мікрогліальні клітини беруть участь у фагоцитозі та функціональному відновленні, а потім ініціюють подальші зміни судинної проникності, що викликає реакцію аноксії клітин [8, 9]. Було також показано, що активація імунної системи після ЧМТ призводить до міграції макрофагів та моноцитів у пошкоджену ділянку мозку з подальшим вивільненням медіаторів запалення (IL-1 β та IL-6) і додатковим ушкодженням нервових клітин [10].

Отже, ЧМТ викликає складний набір первинних і вторинних реакцій, які ушкоджують ділянки мозку, що обслуговують певні когнітивні функції. Вогнищеві контузії викликають стійкі когнітивні порушення, типи яких відносно нескладно зрозуміти на основі сучасних нейроанатомічних уявлень [11]. Крім того, ушкодження аксонів у поєднанні з цитотоксичними процесами є найпоширенішою патоморфологічною причиною посттравматичних когнітивних порушень і мають найбільший вплив на швидкість та ефективність обробки інформації. Деструкція та напруження аксонів також викликає різке підвищення рівня більшості церебральних нейромедіаторів, причому травматично індукований надлишок глутамату та ацетилхоліну є найбільш нейротоксичним [12]. Деструктивні наслідки такого надлишку нейромедіаторів виявляються найбільшими в тих областях, де ці нейромедіатори локалізовані сумісно – в структурах енторинально-гіпокампального комплексу, базальному відділі переднього мозку, смугастому тілі, фронтальній корі головного мозку

(ГМ). Ексайтотоксичні пошкодження призводять до порушення когнітивних функцій (збудження, швидкості обробки інформації, уваги, пам'яті тощо), які реалізуються за участі уражених ділянок мозку [13, 14]. З мірою того, як гострий нейромедіаторний дисбаланс поступово редукується або трансформується, довготривалий дефіцит розвивається в церебральних холінергічних системах і, можливо, також у катехоламінергічних структурах, що пролонгує або поглиблює порушення когнітивних функцій. Повідомляється також, що існує тісний зв'язок між нейродеструктивними процесами, когнітивними порушеннями та синаптичною передачею [12, 15-17].

Таким чином, дотепер уявлення про взаємозв'язок між послідовністю патогенетичних механізмів ТУГМ і характером когнітивних порушень після ЧМТ залишаються фрагментарними. Наразі суперечливими є відомості про динаміку віддалених посттравматичних змін міжклітинних взаємодій у різних відділах ГМ. Потребують суттєвих уточнень відомості про чутливість різних нейронів і клітин нейроглії до травми та їх здатність до відновлення в залежності від локалізації ушкоджень та характеру перебудов гемомікроциркуляції в посттравматичному періоді.

Мета

Визначення тканинних і клітинних посттравматичних змін структури передцентральної звинини лобової частки ГМ щурів з різними нейрокогнітивними розладами у різні терміни після ТЧМТ.

Матеріали та методи

Для моделювання ТЧМТ у дорослих нелінійних щурів-самців (віком від 4 до 6 міс) з вагою 300-400 г застосовували «модель ударного прискорення» [18, 19]. Перед нанесенням травми під загальною анестезією виконували сагітальний розріз шкіри голови завдовжки 2 см по середній лінії з оголенням брегми і лямбди та фіксували сталеву монету діаметром 1 см за допомогою ціаноакрилового клею. Стандартизована ТЧМТ наносилась шляхом вільного падіння грузика вагою 450 г із висоти 170 см. Перед моделюванням ТЧМТ, а також через 10, 20 і 40 діб після нього щурам проводили комплексне загальне та неврологічне обстеження, що включало: 1) оцінку неврологічного дефіциту за шкалою mNSS (Modified Neurological Severity Scores) з проведенням тестів рівноваги на трубі, асиметрії розгинання лап та розміщення; 2) тест «відкрите поле»; 3) тест умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) [20-22].

За результатами неврологічних тестів щури були розподілені на три групи: 1) перша – тварини після ЧМТ з нейрокогнітивними розладами і порушеннями пам'яті; 1) друга – тварини після ЧМТ з нейрокогнітивними розладами без порушень пам'яті; 3) група порівняння – тварини після ЧМТ без нейрокогнітивних розладів. Контрольну групу складали інтактні щури віком $4,8 \pm 0,6$ міс з

вагою 347 ± 28 г.

Всі дослідження з лабораторними тваринами проводили із дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Ванкуверської декларації про проведення дослідів на тваринах, Постанови Першого Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001), Положення з біоетики МОЗ України від 1 листопада 2000 р. № 281, Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3446-IV від 21 лютого 2003 р. згідно з директивою Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання постанов, законів, адміністративних положень Держав ЄС з питань захисту тварин, які використовуються з науковою метою [23, 24].

Для патоморфологічного дослідження мозок щурів після евтаназії вилучали з порожнини черепа, макроскопічно оцінювали стан м'яких оболонок, рельєфу, наявності крововиливів та локалізацію осередків забою. Для морфологічного дослідження великий мозок фіксували протягом 24 год у 10%-му розчині забуференого формаліну. Після фіксації мозок розрізали у фронтальній площині на частки на рівні лоової частки із сенсомоторною корою з подальшим виготовленням парапластових блоків. Гістологічні зрізи завтовшки 5–7 мкм із забарвленням їх за Нісслем (тіоніном із додаванням крезилвіолету) або імпрегнацією сріблом вивчали за допомогою світлооптичного мікроскопа AxioSkope A1 («Carl Zeiss», Німеччина).

Імуногістохімічне дослідження з використанням первинних антитіл (β -tubulin, Synaptophysin, GAP43, NCAM1, N-cadherin, GFAP – «Thermo Scientific», USA) виконували у відповідності до протоколу, який містив наступні етапи. Фіксовані на предметних скельцях гістологічні зрізи демаскувались упродовж 20 хв у мікрохвильовій печі при $+100^{\circ}\text{C}$ у цитратному буфері (pH 6,0). Для оцінки специфічності імуногістохімічного забарвлення проводили контрольні реакції. На наступному етапі із залученням системи візуалізації Lab Visison Quanto («Thermo Scientific», USA) проводили обробку скелець та препаратів мозку з кожним реагентом упродовж 10 хвилин з проміжним промиванням у Трис-буферному розчині. В якості хромогена використовували 3,3'-Diaminobenzidine («DakoCytomation», Данія). Для диференціювання кортикальних структур зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра відповідно до загальних стандартів.

Проводили фотофіксацію досліджуваних ділянок передцентральної звивини лобової частки великого мозку за допомогою цифрової фотокамери AxioCam ERc 5s («Carl Zeiss», Німеччина). Обробку отриманих мікрофотографій проводили за допомогою програмного забезпечення AxioVs40 V 4.6.3.0 («Carl Zeiss Imaging Solutions

GmbH», Німеччина). Проводили підрахунок чисельної щільності нейронів, середнього діаметра перикаріона пірамідних нейронів зовнішнього та внутрішнього пірамідних шарів, чисельної щільності макрогліоцитів, мікрогліоцитів і гемокapілярів кори з використанням програмного пакету ImageJ 1,47v [25].

Варіаційно-статистична обробка отриманих результатів проводилася з урахуванням критерію t Стьюдента. У тому випадку, якщо отримане в дослідженні емпіричне розподілення не відповідало нормальному закону, оцінку відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона для пов'язаних вибірок та Манна-Уїтні для непов'язаних вибірок або із використанням рангового критерію Вандер-Вардена. При проведенні статистичної обробки отриманих квантифікованих результатів усі необхідні розрахунки виконували в оболонці електронної таблиці Excel при використанні відповідних формул і з використанням ліцензійного програмного пакету Statistica v6.1 (Statsoft Inc., USA) (серійний номер AGAR909E415822FA).

Результати та їх обговорення

При морфологічному дослідженні ГМ щурів всіх експериментальних груп через 10 діб після ТЧМТ у корі передцентральної звивини стабільно виявлялися характерні за структурою і клітинним складом гліальні рубці, які за локалізацією відповідали ділянці нанесення травми і значно варіювали за формою та розмірами. В усіх досліджуваних групах також зустрічалися випадки множинних рубцевих змін фронтальної кори. На межі між поверхнею гліального рубця і прилеглими ділянками кори з незміненою поширеною будовою спостерігалось накопичення значної кількості мікрогліоцитів, проте будь-які сполучнотканинні або мікросудинні ознаки активного нейрозапалення у рубцевій ділянці через 10 діб після нанесення травми, а також на подальших термінах експерименту, були відсутні. Протягом наступних термінів експерименту об'єм і кількість рубцево змінених ділянок кори суттєво не змінювались в жодній з досліджуваних груп щурів, що свідчило про гальмування та завершення астроцитарної гіперплазії до кінця вивченого посттравматичного періоду.

У складі фронтальної кори зі збереженою цитоархітектонікою у тварин всіх груп дослідження через 10 діб після нанесення травми співвідношення за товщиною між шістьма шарами нейронів не відрізнялося від групи інтактних тварин, проте відбувалися численні нейродегенеративні та деструктивні зміни сірої речовини, які були наслідками посттравматичного цитотоксичного каскаду під час розвитку травматичної хвороби ГМ. Зокрема, спостерігалися ознаки помірного дифузного міжклітинного та периваскулярного набряку, масованої клітинної загибелі нейронів, різноманітні ушкодження мікроциркуляторного русла, дегенеративні зміни переважно пірамідних

нейронів.

Морфометричний підрахунок чисельної щільності нейронів всіх типів за допомогою імуногістохімічного визначення експресії β -тубуліну, який є елементом мікротрубочок виключно в нейроцитах і дозволяє їх чітко ідентифікувати, показав різке зменшення загального вмісту клітин в корі передцентральної звивини ГМ щурів першої і другої груп – на 50,2% ($p < 0,05$) і 47,5% ($p < 0,05$) відповідно, в той час як у групі порівняння параметр зменшувався у помірному ступені – на

25,9% ($p < 0,05$). При цьому у першій і другій групах тварин чисельна щільність нейронів коливалася в обмеженому діапазоні на всіх термінах експерименту та статистично вагомо поступалася показнику групи порівняння (табл. 1). Через 20 і 40 діб після ТЧМТ у групі порівняння спостерігалася поступове ущільнення нейронів і наближення до нормальних значень, вочевидь, за рахунок редукції перичелюлярного і периваскулярного набряку та інших тканинних ознак нейродеструкції.

Таблиця 1

Чисельна щільність нейроцитів кори передцентральної звивини, $\times 10^2 \text{ мм}^{-2}$ ($M \pm m$)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	13,1 $\pm$ 1,2 * **	13,8 $\pm$ 1,1 * **	19,5 $\pm$ 2,3 *
20 діб	12,4 $\pm$ 0,9 * **	12,4 $\pm$ 1,9 * **	21,7 $\pm$ 3,0
40 діб	11,8 $\pm$ 1,7 * **	12,1 $\pm$ 1,3 * **	23,0 $\pm$ 2,8

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів ($26,3 \pm 1,8 \times 10^2 \text{ мм}^{-2}$); ** – $p < 0,05$ при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Загальна щільність і морфологія дрібних мультиполярних нейроцитів молекулярного шару, а також малих пірамідних, зірчастих і гальмівних нейронів зовнішнього зернистого шару кори передцентральної звивини не відрізнялися суттєво від нормальних характеристик навіть у тих ділянках, які були наближені до астроцитарних рубців, що утворилися після локального нанесення ТЧМТ. Переважна кількість збудливих зірчастих нейронів внутрішнього зернистого шару також мали незмінену морфологію в усіх групах тварин. В окремих спостереженнях через 10 діб після травми такі клітини мали ознаки часткового хроматолізу та редуковані дендрити.

Більшість великих і середніх пірамідних нейронів зовнішнього пірамідного шару після ТЧМТ зберігали характерну конічну форму, часто містили ознаки хроматолізу у всіх досліджуваних

групах тварин через 10 діб від початку експерименту. Через 20 і 40 діб після нанесення травми пірамідні нейрони з обмеженням синтетичної активності стабільно візуалізувалися в корі щурів першої та другої груп, в той час як у групі порівняння ушкоджені нейроцити у складі зовнішнього пірамідного шару не виявлялися.

Морфометричний аналіз показав, що за розмірами нейрони зовнішнього пірамідного шару істотно не різнилися між трьома експериментальними групами, проте суттєво поступалися нормальному значенню середнього діаметра перикаріону інтактних щурів на всіх термінах дослідження (табл. 2). При цьому найвиразніше зменшення розмірів нейроцитів спостерігалася в першій групі тварин через 20 і 40 діб після ТЧМТ – на 39,6% ($p < 0,05$) і 41,5% ($p < 0,05$) відповідно.

Таблиця 2

Середній діаметр перикаріона пірамідних нейронів зовнішнього пірамідного шару кори передцентральної звивини, мкм ($M \pm m$)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	5,17 $\pm$ 0,48 *	5,08 $\pm$ 0,39 *	5,12 $\pm$ 0,44 *
20 діб	4,46 $\pm$ 0,41 *	4,76 $\pm$ 0,44 *	5,07 $\pm$ 0,51 *
40 діб	4,32 $\pm$ 0,35 *	4,71 $\pm$ 0,41 *	4,95 $\pm$ 0,41 *

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів ($7,39 \pm 0,51 \text{ мкм}$); ** – $p < 0,05$ при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Великі й гігантські пірамідні клітини внутрішнього пірамідного шару, які утворюють екстракортикальні еферентні шляхи, за морфологією

значно різнилися. Поряд із поодинокими апоптично зміненими формами зустрічалися гіперхромні піраміди, звернені своїми вершинами до пове-

рхні кори. Переважали пірамідні нейрони, які містили ознаки хроматолізу.

Середній діаметр перикаріонів пірамідних нейронів внутрішнього пірамідного шару кори передцентральної звивини у всіх досліджуваних

групах тварин значно поступався нормальному значенню (табл. 3). Найбільша редукція розмірів нейроцитів спостерігалася через 20 діб після ТЧМТ у щурів першої (-46,3%; $p < 0,05$) і другої (-43,2%; $p < 0,05$) експериментальних груп.

Таблиця 3
Середній діаметр перикаріона пірамідних нейронів внутрішнього пірамідного шару кори передцентральної звивини, мкм ($M \pm m$)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	8,38 $\pm$ 1,21 *	9,14 $\pm$ 1,36 *	8,85 $\pm$ 0,94 *
20 діб	7,64 $\pm$ 0,86 *	8,08 $\pm$ 1,17 *	8,40 $\pm$ 0,61 *
40 діб	8,05 $\pm$ 1,02 *	8,23 $\pm$ 1,31 *	9,42 $\pm$ 1,18 *

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів (14,23 $\pm$ 1,06 мкм); ** – $p < 0,05$ при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Нейронний склад мультиформного шару не відрізнявся від типових нормальних характеристик і містив клітини Мартінотті, дрібні пірамідні та гальмівні горизонтальні нейроцити з незмінною морфологією. Будь-яких відмінностей по досліджуваних групах тварин або термінах експерименту не виявлялося.

При аналізі впливу ТЧМТ на синаптичний апарат фронтальної кори за допомогою моноклональних антитіл до синаптофізину (p38), який є трансмембранним глікопротеїном синаптичних везикул, у всіх тварин спостерігалася різке зниження експресії даного маркера у тканині передцентральної звивини через 10 діб після травми у порівнянні з інтактними тваринами. Дифузний характер розподілення p38-позитивних структур не відрізнявся між досліджуваними групами тварин. Через 20 і 40 діб після ТЧМТ експресія синаптофізину у фронтальній корі щурів першої групи суттєво не змінювалась, залишаючись на низькому рівні. Навпроти, у тварин другої експериментальної групи та групи порівняння відбувалося часткове відновлення щільності p38-позитивних синапсів протягом посттравматичного періоду.

Імуногістохімічне дослідження маркера GAP43, який локалізований у мембрано-зв'язаній або цитоплазматичній формах у синапсах під час їх активного новоутворення та віддзеркалює регенераторний потенціал аксонів, показало відсутність GAP43-позитивних структур у фронтальній корі як у інтактних щурів, так і в групах тварин першої та другої експериментальних груп протягом досліджуваного посттравматичного періоду. У щурів групи порівняння в передцентральної звивині ГМ через 20 і 40 діб після травми в окремих ділянках молекулярного і обох зернистих шарів фронтальної кори спостерігалася помірна експресія GAP43, що свідчило про можливість ремоделювання пресинаптичних терміналей аксонів.

З використанням маркерів CD56 (NCAM1) і N-кадгерину було встановлено, що інтенсивність

імуногістохімічної мітки на поверхні кожного нейроцита у фронтальній корі була подібною до характеру експресії цих маркерів на зовнішній мембрані інтактного нейрона, проте загальний ступінь специфічного забарвлення зрізів був суттєво меншим після травматичного ушкодження ГМ, ніж у інтактних щурів, за рахунок клітинної загибелі значної частки нейронів. Розподіл CD56-позитивних і N-кадгерин-позитивних нейроцитів у щурів першої та другої груп не змінювався протягом всього посттравматичного періоду.

При вивченні зразків кори передцентральної звивини після нанесення ТЧМТ у зонах зі збереженою цитоархітектонікою спостерігалися характерні ознаки апоптотичної загибелі значної кількості пірамідних нейронів. Найбільша їх частота відзначалася у тварин першої і другої груп на всіх термінах експерименту, що свідчило про реалізацію активного нейродегенеративного процесу шляхом апоптозу нейронів протягом всього експерименту. У щурів групи порівняння інтенсивна апоптотична загибель нейроцитів спостерігалася через 10 діб після ТЧМТ і в подальшому ставала менш вираженою. Некротично змінені нейрони у фронтальній корі не виявлялися в жодній групі тварин на всіх досліджуваних термінах після травми. Прояви аутофагії пірамідних нейроцитів внутрішнього пірамідного шару зустрічалися в поодиноких спостереженнях в усіх групах щурів; їх частота не залежала від строку після нанесення ТЧМТ.

Морфологічний аналіз гліального компонента кори передцентральної звивини ГМ щурів виявив суттєві морфогенетичні перебудови макрогліоцитів як за характером їх просторового перерозподілу, так і за проліферативними властивостями. Зокрема, через 10 діб після нанесення ТЧМТ у фронтальній корі тварин всіх експериментальних груп спостерігалася значне накопичення протоплазматичних астроцитів у перикапілярних просторах, що часто було асоційовано з

осередками набряку і підвищенням мітотичної активності гліоцитів. В той же час виявлялися значні за об'ємом ділянки нейропіля, в яких щільність розташування волокнистих астроцитів була помітно нижчою, ніж у інтактних щурів. В осередках астроцитарного дефіциту виявлялися поодинокі клітини, які мали довгі відростки, але не контактували з іншими астроцитами. Кількість відростків і ступінь їх розгалуження значно варіювали. Через 20 і 40 діб посттравматичного періоду у тварин першої і другої груп дослідження осередки астроцитарного дефіциту зберігалися, у щурів групи порівняння – зустрічалися лише в поодиноких спостереженнях.

Імуногістохімічне дослідження маркерів CD56 (NCAM1) і N-кадгерину, які експресуються на поверхні нейронів і гліоцитів і беруть участь в утворенні та підтримці міжклітинних контактів, показало нерівномірний розподіл імуногістохімічної мітки в корі передцентральної звивини ГМ тварин у всіх досліджуваних групах. Зокрема, через 10 діб після нанесення ТЧМТ ущільнені протоплазматичні астроцити навколо гемокапілярів активно експресували обидва означені маркери на

своїй поверхні, в той час як у нейропілі між мікророслинами візуалізувалися відокремлені один від одного CD56-негативні і N-кадгерин-негативні волокнисті астроцити.

Морфометричний аналіз макрогліоцитів на гістопрепаратах з використанням моноклональних антитіл до GFAP показав, що через 10 діб від початку експерименту чисельна щільність клітин у фронтальній корі щурів поступалася нормальному значенню в першій групі – на 28,2% ($p < 0,05$), у другій – на 25,4% ($p < 0,05$), у групі порівняння – на 27,4% ($p < 0,05$). Через 20 діб після нанесеної травми у тварин першої і другої експериментальних груп ступінь астроцитарного дефіциту зростав; у щурів групи порівняння, навпроти, – ставав менш виразним і до кінця експерименту втрачав статистичну значущість при порівнянні з нормою (табл. 4). Через 40 діб після ТЧМТ у тварин першої групи параметр поступався показнику інтактних тварин на 49,0% ($p < 0,05$), показнику групи порівняння – на 43,6% ($p < 0,05$). У тварин другої групи чисельна щільність макрогліоцитів була нижчою за норму на 41,3% ($p < 0,05$), за рівень групи порівняння – на 35,1% ($p < 0,05$).

Таблиця 4

Чисельна щільність макрогліоцитів кори передцентральної звивини, $\times 10^2 \text{ мм}^{-2}$ ($M \pm m$)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	148 $\pm$ 19 *	155 $\pm$ 18 *	151 $\pm$ 14 *
20 діб	123 $\pm$ 17 * **	129 $\pm$ 16 * **	165 $\pm$ 12 *
40 діб	106 $\pm$ 13 * **	122 $\pm$ 14 * **	188 $\pm$ 16 *

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів ($208 \pm 19 \times 10^2 \text{ мм}^{-2}$); ** – $p < 0,05$ при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

У різних шарах кори передцентральної звивини ГМ тварин досліджуваних груп спостерігалися неоднакові за морфологією мікрогліоцити. Переважна більшість цих клітин мала сплюснену форму та складно-розгалужені відростки, які занурювалися між нейронами або в глибину нейропіля. Також поблизу гемокапілярів зустрічалися мікрогліоцити кулястої форми з поодинокими довгими хвилеподібними відростками, які контактували з елементами ГЕБ. У тварин першої та другої експериментальних груп, на відміну від щурів групи порівняння, у пірамідних шарах периваскулярно розташовувалися типові циркулюючі макрофаги та поодинокі лімфоцити, що вказувало на латентний перебіг запального процесу в окремих ділянках кори за відсутності ознак навколосудинного набряку. Вочевидь, підвищення фагоцитарного потенціалу тканини за даних обставин свідчило не про індукцію імунної відповіді, а було пов'язано з необхідністю елімінації наслідків масованої нейродегенерації та деструкції нейронів після ТЧМТ.

Морфометрично загальна динаміка змін чисельної щільності мікроглії мала схожу спрямованість у трьох експериментальних групах – від різко підвищеної кількості мікрогліоцитів через 10 діб експерименту до помірного ущільнення мікроглії через 40 діб після ТЧМТ (табл. 5). Статистично значущих відмінностей параметра у першій і другій групах дослідження від показників групи порівняння не спостерігалось протягом усього посттравматичного періоду.

З одного боку, наявність периваскулярної амебоїдної мікроглії з малою кількістю відростків вказувала на взаємозв'язок їх структурної організації з виконанням захисної функції на рівні ГЕБ. З іншого боку, наявність рециркулюючих макрофагів у поєднанні з мікроглією свідчила про активацію процесів фагоцитозу та елімінації залишків різноманітних постклітинних структур внаслідок ТЧМТ.

Вивчення ГМЦР кори передцентральної звивини ГМ через 10 діб після ТЧМТ виявило низку мікророслинних перебудов, які були залучені до

посттравматичного цитотоксичного каскаду і суттєво різнилися в досліджуваних експериментальних групах. Зокрема, у першій і другій групах тварин спостерігалось значне зростання кількості новоутворених гемокапілярів з типовою будовою ендотеліальної стінки і звичайним кровонаповненням, у супроводі астроцитарної глії і зі сформованим ГЕБ. Крім таких гемокапілярів з інтактною будовою, спостерігалася значна кількість ушкоджених мікросудин, з ознаками стазу і слалдування еритроцитів, інколи з частково або повністю облітерованим просвітом. За допомогою імуногістохімічного визначення експресії маркера GFAP на зовнішній поверхні ушкоджених капілярів виявлялася велика кількість загущено

упакованих протоплазматичних астроцитів. В окремих випадках астроглія утворювала клітинні нашарування на поверхні мікросудин у вигляді щільних муфт, що вказувало на блокування трансендотеліального транспорту і підтверджувалось результатами імуногістохімічного дослідження молекул клітинної адгезії – CD56 і N-кадгерину. Також виявлялися мікросудини з ознаками внутрішньосудинного мікротромбозу в оточенні дрібних осередків вторинних крововиливів, з плазматичним просоченням гемокапілярної стінки та периваскулярного простору. Зустрічалися поодинокі гемокапіляри з некрозом, деструкцією або фрагментацією ендотеліальної стінки.

Таблиця 5

Чисельна щільність мікрогліоцитів кори передцентральної звивини, мм⁻² (M ± m)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	3,08 ± 0,45 *	2,84 ± 0,33 *	2,96 ± 0,36 *
20 діб	2,41 ± 0,32 *	2,61 ± 0,40 *	2,39 ± 0,29 *
40 діб	2,38 ± 0,35 *	2,50 ± 0,34 *	2,27 ± 0,31 *

Примітка: * – p < 0,05 при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів (1,44 ± 0,17 × 10² мм⁻²); ** – p < 0,05 при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Через 20 діб після ТЧМТ у корі передцентральної звивини ГМ щурів першої і другої експериментальних груп зберігалася значна кількість ушкоджених мікросудин з ознаками стазу і слалдування еритроцитів, що свідчило про залучення до деструктивного процесу новоутворених гемокапілярів. Через 40 діб після нанесення травми помітно зменшувалась кількість патологічно змінених мікросудин з нашаруваннями астроцитів на зовнішній поверхні; зустрічалися поодинокі фрагментовані гемокапіляри та дрібні осередки діapedезних крововиливів.

На відміну від першої і другої експериментальних груп, у тварин групи порівняння ушкоджені мікросудини в оточенні астроцитарних конгломератів у складі фронтальної кори зустрічалися у значно меншій кількості. Зруйновані або

некротизовані гемокапіляри, діapedезні або петехіальні крововиливи не виявлялися. Переважна кількість гемокапілярів мала інтактну структуру стінки й утворювала типовий за будовою ГЕБ. Через 20 і 40 діб після нанесення травми у тварин даної групи кількість патологічно змінених гемокапілярів помітно зменшувалась відносно 10-ї доби експерименту.

Морфометричне вивчення мікросудин фронтальної кори показало, що через 10 діб після ТЧМТ загальна чисельна щільність гемокапілярів у тварин першої групи на 48,3% (p < 0,05) перевищувала нормальне значення, другої групи – на 63,6% (p < 0,05). В обох випадках відмінності від групи порівняння не перевищували рівня статистичної значущості (табл. 6).

Таблиця 6

Чисельна щільність гемокапілярів кори передцентральної звивини, мм⁻² (M ± m)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	83,2 ± 10,6 *	91,8 ± 12,3 *	80,5 ± 10,9 *
20 діб	77,6 ± 9,8 * **	80,4 ± 10,1 * **	63,4 ± 8,3
40 діб	63,0 ± 8,2	61,2 ± 7,3	59,4 ± 8,8

Примітка: * – p < 0,05 при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів (56,1 ± 7,4 мм⁻²); ** – p < 0,05 при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Через 20 діб від початку експерименту чисельна щільність гемокапілярів у тварин першої

групи перевищувала значення інтактних щурів на 38,3% (p < 0,05), показник групи порівняння – на

22,4% ($p < 0,05$). У другій експериментальній групі параметр перевищував нормальне значення на 43,3% ($p < 0,05$), показник групи порівняння – на 26,8% ($p < 0,05$). У тварин групи порівняння щільність кровоносних мікросудин через 10 діб після ТЧМТ зростала на 43,5% ($p < 0,05$) відносно величини інтактних тварин, але у подальші терміни експерименту поверталась до нормального рівня.

Підсумок

У складі фронтальної кори зі збереженою цитоархітектонікою поблизу зони удару через 10 діб після нанесення травми відбуваються численні нейродегенеративні та деструктивні зміни сірої речовини, які є наслідком посттравматичного цитотоксичного каскаду, за рахунок помірного дифузного міжклітинного та периваскулярного набряку, масованої апоптотичної загибелі нейроцитів, різноманітних ушкоджень мікроциркуляторного русла, дегенеративних змін переважно пірамідних нейронів. Через 20 і 40 діб після нанесення травми нейрони з обмеженням синтетичної активності та ознаки нейродеструкції стабільно зберігаються в корі шурів з нейрокогнітивними розладами незалежно від ступеня мнестичних порушень, в той час як у тварин без когнітивного дефіциту ушкоджені нейроцити у складі пірамідних шарів не виявляються.

Через 10 діб після ТЧМТ у фронтальній корі тварин всіх груп спостерігається значне накопичення протоплазматичних астроцитів у перикапілярних просторах, що часто асоційовано з осередками набряку і підвищенням мітотичної активності гліоцитів. При цьому утворюються значні за об'ємом ділянки нейропілія з низькою щільністю розташування волокнистих астроцитів. Через 20 і 40 діб посттравматичного періоду у тварин з нейрокогнітивними розладами осередки астроцитарного дефіциту зберігаються, у шурів групи порівняння – зустрічаються дуже рідко.

Через 10 діб після ТЧМТ у тварин з нейрокогнітивними розладами спостерігається значне зростання кількості новоутворених гемокапілярів

з типовою будовою ендотеліальної стінки і звичайним кровонаповненням, у супроводі астроцитарної глії і зі сформованим ГЕБ. На поверхні ушкоджених капілярів виявляється велика кількість загущено упакованих протоплазматичних астроцитів. В окремих випадках астроглія утворює клітинні нашарування на поверхні мікросудин у вигляді щільних муфт, що вказує на блокування трансендотеліального транспорту. Також виявляються мікросудини з ознаками внутрішньосудинного мікротромбозу в оточенні дрібних осередків вторинних крововиливів і поодинокі гемокапіляри з деструкцією ендотеліальної стінки. Через 20 діб після ТЧМТ до деструктивного процесу залучаються новоутворені гемокапіляри. Через 40 діб після травми помітно зменшується кількість ушкоджених мікросудин з нашаруваннями астроцитів на зовнішній поверхні. На відміну від цих змін, у тварин групи порівняння ушкоджені мікросудини в оточенні астроцитарних конгломератів зустрічаються у значно меншій кількості, переважна кількість гемокапілярів має інтактну структуру стінки й утворює типовий ГЕБ. У тварин без нейрокогнітивних розладів через 20 і 40 діб після травми відбувається помітна редукція мікроциркуляторних ушкоджень.

Перспективи подальших розробок полягають у з'ясуванні взаємозв'язку між патоморфологічними механізмами перетворень при ТУГМ і характером когнітивних порушень після ЧМТ. Актуальним також є дослідження чутливості нейронів і гліоцитів до травми та їх здатності до відновлення в залежності від локалізації ушкоджень та характеру перебудов гемомікроциркуляції в посттравматичному періоді.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Оптимізація діагностики та лікування гострих церебральних пошкоджень» (номер державної реєстрації 0122U000086).

Літературні джерела References

1. Howlett JR, Nelson LD, Stein MB. Mental Health Consequences of Traumatic Brain Injury. *Biol Psychiatry*. 2022;91(5):413-420. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.09.024.
2. James SL, Theadom A, Ellenbogen RG. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury, 1990-2016 a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019;18(1):56-87. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30415-0.

3. Zohar O, Lavy R, Zi X, Nelson TJ, Hongpaisan J, Pick CG, Alkon DL. PKC activator therapeutic for mild traumatic brain injury in mice. *Neurobiol Dis* 2011;41(2):329-337. DOI: 10.1016/j.nbd.2010.10.001
4. Chary K, Nissi MJ, Nykänen O, Manninen E, Rey RI, Shmueli K, Sierra A, Gröhn O. Quantitative susceptibility mapping of the rat brain after traumatic brain injury. *NMR Biomed*. 2021;34(2):e4438. doi: 10.1002/nbm.4438.
5. Wu M, Wang C, Gong Y, Huang Y, Jiang L,

- Zhang M, Gao R, Dang B. Potential mechanism of TMEM2/CD44 in endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis in a rat model of traumatic brain injury. *Int J Mol Med.* 2023;52(6):119. doi: 10.3892/ijmm.2023.5322.
6. Di Giovanni S, Movsesyan V, Ahmed F. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(23):8333-8338. DOI: 10.1073/pnas.0500989102
7. Jones NC, Cardamone L, Williams JP, Salzb erg MR, Myers D, O'Brien TJ. Experimental traumatic brain injury induces a pervasive hyperanxious phenotype in rats. *J Neurotrauma.* 2008;25(11):1367-1374. DOI: 10.1089/neu.2008.0641
8. Bachstetter AD, Zhou Z, Rowe RK. MW151 Inhibited IL-1 β Levels after Traumatic Brain Injury with No Effect on Microglia Physiological Responses. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149451. DOI: 10.1371/journal.pone.0149451
9. Wu W, Tian R, Hao S, Xu F, Mao X, Liu B. A pre-injury high ethanol intake in rats promotes brain edema following traumatic brain injury. *Br J Neurosurg.* 2014;28(6):739-745. DOI: 10.3109/02688697.2014.915007
10. Shaw BC, Anders VR, Tinkey RA, Habean ML, Brock OD, Frostino BJ, Williams JL. Immunity impacts cognitive deficits across neurological disorders. *J Neurochem.* 2023;10.1111/jnc.15999. doi: 10.1111/jnc.15999.
11. Nie L, He J, Wang J, Wang R, Huang L, Jia L, Kim YT, Bhawal UK, Fan X, Zille M, Jiang C, Chen X, Wang J. Environmental Enrichment for Stroke and Traumatic Brain Injury: Mechanisms and Translational Implications. *Compr Physiol.* 2023;14(1):5291-5323. doi: 10.1002/cphy.c230007.
12. Song H, Chen C, Kelley B, Tomasevich A, Lee H, Dolle JP, Cheng J, Garcia B, Meaney DF, Smith DH. Traumatic brain injury recapitulates developmental changes of axons. *Prog Neurobiol.* 2022;217:102332. doi: 10.1016/j.pneurobio.2022.102332.
13. Macks C, Jeong D, Bae S, Webb K, Lee JS. Dexamethasone-Loaded Hydrogels Improve Motor and Cognitive Functions in a Rat Mild Traumatic Brain Injury Model. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19):11153. doi: 10.3390/ijms231911153.
14. Yang Z, Zhu T, Pompilus M, Fu Y, Zhu J, Arjona K, Arja RD, Grudny MM, Plant HD, Bose P, Wang KK, Febo M. Compensatory functional connectome changes in a rat model of traumatic brain injury. *Brain Commun.* 2021;3(4):244. doi: 10.1093/braincomms/fcab244.
15. Gu YL, Zhang LW, Ma N. Cognitive improvement of mice induced by exercise prior to traumatic brain injury is associated with cytochrome c oxidase. *Neurosci Lett.* 2014;570:86-91. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.04.004
16. Hui Y, Zhao H, Shi L, Zhang H. Traumatic Brain Injury-Mediated Neuroinflammation and Neurological Deficits are Improved by 8-Methoxypsoralen Through Modulating PPAR γ /NF- κ B Pathway. *Neurochem Res.* 2023;48(2):625-640. doi: 10.1007/s11064-022-03788-6.
17. Griffiths DR, Law LM, Young C, Fuentes A, Truran S, Karamanova N, Bell LC, Turner G, Emerson H, Mastroeni D, Gonzales RJ, Reaven PD, Quarles CC, Migrino RQ, Lifshitz J. Chronic Cognitive and Cerebrovascular Function after Mild Traumatic Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma.* 2022;39(19-20):1429-1441. doi: 10.1089/neu.2022.0015.
18. Marmarou AI, Foda MA, van den Brink W. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994;80(2):291-300. doi:10.3171/jns.1994.80.2.0291
19. Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg.* 1994;80(2):301-313. doi:10.3171/jns.1994.80.2.0301
20. Buresh Ja, Bureshova O, Hyuston DP. Metody i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya [Methods and basic experiments for the study of the brain and behavior]. Moskva: High school, 1991. 399 p. Russian.
21. Kaluev AV. Problemy izucheniya stressovogo povedeniya [Problems of studying stress behavior]. Kyiv: CSF, 1999. 132 p. Russian.
22. Inozemtsev AN, Belnik AP, Ostrovskaya RU. Izucheniye uslovnogo refleksa passivnogo izbeganiya v modifitsirovannoy trekhkamernoy ustanovke. [Study of the conditioned reflex of passive avoidance in a modified three-chamber setup]. *Experimental and clinical pharmacology.* 2007;70(2):67-69. Russian.
23. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasburg: Council of Europe. 1986;123:52.
24. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union.* 2010;53(L276):33-79.
25. Poslavska OV. Vyznachennyya liniynykh rozmiriv ta ploshch okremykh morfolohichnykh ob"yektiv na mikrofotohrafiyakh za dopomohoyu prohramy ImageJ. [Determination of linear dimensions and areas of individual morphological objects on photomicrographs using the ImageJ program]. *Morphologia.* 2016;10(3):377-381.

Мізякіна К.В., Дзяк Л.А. Морфологічна характеристика фронтальної кори головного мозку щурів з різними нейрокогнітивними розладами після тяжкої черепно-мозкової травми.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Потребують суттєвих уточнень відомості про чутливість різних нейронів і клітин нейроглії до травми та їх здатність до відновлення в залежності від локалізації ушкоджень та характеру перебудов гемомікроциркуляції в посттравматичному періоді. **Мета.** Визначення тканинних і клітинних посттравматичних змін структури передцентральної звивини лобової частки головного мозку щурів з різними нейрокогнітивними розладами у різні терміни після тяжкої ЧМТ. **Методи.** Для відтворення тяжкої ЧМТ у щурів застосовували «модель ударного прискорення». За результатами неврологічних тестів щури були розподілені на три групи: 1) перша – тварини після ЧМТ з нейрокогнітивними розладами і порушеннями пам'яті; 1) друга – тварини після ЧМТ з нейрокогнітивними розладами без порушень пам'яті; 3) група порівняння – тварини після ЧМТ без нейрокогнітивних розладів. Проводили гістологічне, морфометричне та імуногістохімічне дослідження передцентральної звивини лобової частки головного мозку з використанням маркерів β -tubulin, Synaptophysin, GAP43, NCAM1, N-cadherin, GFAP. **Результати та підсумок.** Через 20 і 40 діб після нанесення травми нейрони з обмеженням синтетичної активності та ознаки нейродеструкції стабільно зберігаються в корі щурів з нейрокогнітивними розладами незалежно від ступеня мнестичних порушень, в той час як у тварин без когнітивного дефіциту ушкоджені нейроцити у складі пірамідних шарів не виявляються. Через 10 діб після тяжкої ЧМТ у фронтальній корі тварин всіх груп спостерігається значне накопичення протоплазматичних астроцитів у перикапілярних просторах, що часто асоційовано з осередками набряку і підвищенням мітотичної активності гліоцитів. При цьому утворюються значні за об'ємом ділянки нейропілія з низькою щільністю розташування волокнистих астроцитів. Через 20 і 40 діб посттравматичного періоду у тварин з нейрокогнітивними розладами осередки астроцитарного дефіциту зберігаються, у щурів групи порівняння – зустрічаються дуже рідко. Через 10 діб після тяжкої ЧМТ у тварин з нейрокогнітивними розладами спостерігається значне зростання кількості новоутворених гемокапілярів з типовою будовою. На поверхні ушкоджених капілярів виявляється велика кількість загущено упакованих протоплазматичних астроцитів. Через 40 діб після травми помітно зменшується кількість ушкоджених мікросудин з нашаруваннями астроцитів на зовнішній поверхні. На відміну від цих змін, у тварин без нейрокогнітивного дефіциту порівняння ушкоджені мікросудини в оточенні астроцитарних конгломератів зустрічаються у значно меншій кількості. У тварин без нейрокогнітивних розладів через 20 і 40 діб після травми відбувається помітна редукція мікроциркуляторних ушкоджень.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, щури, нейрокогнітивні розлади, порушення пам'яті, нейродеструкція, фронтальна кора, морфометрія, імуногістохімічні маркери.