

К.В. Мізякіна

Дніпровський державний
медичний університет
Дніпро, Україна

Надійшла: 28.08.2024

Прийнята: 19.09.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.3.67-76>

УДК 591.481.1-001:57.012.4

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУШОПОДІБНОЇ КОРИ У ЩУРІВ З РІЗ- НИМИ НЕЙРОКОГНІТИВНИМИ РОЗЛА- ДАМИ ПІСЛЯ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВОЇ ТРАВМИ

Mizyakina K.V.   Morphological characteristics of the piriform cortex in rats with various neurocognitive disorders after traumatic brain injury.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. In solving numerous issues related to the treatment and rehabilitation of patients with traumatic brain injury, it is of particular interest to study the pathomorphological mechanisms that determine the nature of the formation and dynamics of neurocognitive disorders at various times after the injury. **The study aims** to determine the tissue and cellular posttraumatic changes in the structure of the piriform cortex of rats with various neurocognitive disorders at different times after severe traumatic brain injury. **Methods.** A "shock acceleration model" was used to reproduce severe traumatic brain injury in rats. According to the results of neurological tests, the rats were divided into three groups: 1) the first – animals after trauma with neurocognitive disorders and memory disorders; 1) the second – animals after trauma with neurocognitive disorders without memory disorders; 3) comparison group – animals after trauma without neurocognitive disorders. A histological, morphometric and immunohistochemical study of the piriform cortex was carried out using the markers β -tubulin, Synaptophysin, GAP43, NCAM1, N-cadherin, GFAP. **Results and conclusion.** Neurocognitive disorders with memory impairment in the long-term after TBI are accompanied by a deepening of the degeneration of neurocytes of the piriform cortex and the chronicity of neuroinflammation with the activation of the mechanisms of neuronal apoptosis and gliocyte autophagy. The progression of neurodegeneration is accompanied by the activation of microglia and leads to the disintegration and migration of macrogliaocytes with the formation of an irreversible mosaic astrocytic deficiency and the formation of glial layers in the form of clutches around hemocapillaries. The preservation of memory function in animals with neurocognitive disorders is associated with the limitation of secondary death of neurocytes and the stabilization of the adhesive properties of astroglia of the piriform cortex, which prevents the formation of astrocytic clutches around newly formed hemocapillaries while maintaining the integrity of the blood-brain barrier. In animals without neurocognitive disorders in the long-term post-traumatic period, compensatory mechanisms in the piriform cortex are implemented through effective neovasculogenesis, limitation of perivascular astrocyte hyperplasia, and neuroinflammation, which prevents neurocyte death and leads to activation of synaptic remodeling.

Key words: traumatic brain injury, rats, neurocognitive disorders, piriform cortex, morphology.

Citation:

Mizyakina KV. [Morphological characteristics of the piriform cortex in rats with various neurocognitive disorders after traumatic brain injury]. Morphologia. 2024;18(3):67-76. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.3.67-76>

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

 mizyakina.e@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Широкий спектр нейрокогнітивних розладів формується у більшості хворих з травматичним ушкодженням головного мозку (ТУГМ), причому у 3-10% постраждалих, які мають в анамнезі тяжку черепно-мозкову 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 [4, 8]. 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 [9].

Ексайтотоксичні пошкодження призводять до порушення когнітивних функцій (збудження, швидкості обробки інформації, уваги, пам'яті тощо), які реалізуються за участі уражених ділянок мозку [10, 11]. 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].

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 гомомікроциркуляції в посттравматичному періоді.

Метою дослідження було визначення тканинних і клітинних посттравматичних змін структури грушоподібної кори шурів з різними нейрокогнітивними розладами у різні терміни після тяжкої черепно-мозкової травми.

Матеріали та методи

Для моделювання ТЧМТ у дорослих нелінійних шурів-самців (віком від 4 до 6 міс) з вагою 300-400 г застосовували «модель ударного прискорення» [16, 17]. 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 ціанокрилового 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 шурам 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 [18].

За результатами неврологічних тестів шури були розподілені на три групи: 1) перша – тварини після ЧМТ з нейрокогнітивними розладами і порушеннями пам'яті; 2) друга – тварини після ЧМТ з нейрокогнітивними розладами без порушень пам'яті; 3) група порівняння – тварини після ЧМТ без нейрокогнітивних розладів. Контрольну групу складали інтактні шури 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 [19, 20].

Для патоморфологічного дослідження мозок шурів 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 годин у 10%-му розчині забуференого формаліну. Після фіксації мозок розрізали у фронтальній площині на часточки на рівні лімбічної частки з подальшим виготовленням парапластових блоків. Гістологічні зрізи завтовшки 5-7 мкм із забарвленням їх за Нісслем (тіоніном із додаванням крезил-фіолету) або імпрегнацією сріблом [21, 22] вивчали за допомогою світлооптичного мікроскопа AxioSkoep 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 хвилин 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 скельць 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 [23, 24].

Проводили фотофіксацію досліджуваних ділянок піріформної кори за допомогою цифрової фотокамери Axiosam ERe 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, 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 Стюдента. 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 Ван-дер-Вардена за стандартними процедурами [26]. 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

При морфологічному дослідженні ГМ шурів всіх експериментальних груп у грушоподібній корі, яка є зоною протиудару у застосованій моделі травми, виявлялись численні uszkodження клітинного складу сірої речовини, а також характерні нейродегенеративні та деструктивні зміни, які були наслідками посттравматичного цитотоксичного каскаду під час розвитку травматичної хвороби ГМ. Через 10 діб після ТЧМТ поряд із дрібними осередками астроцитарного гліозу спостерігались ознаки помірного дифузного міжклітинного та периваскулярного набряку, масованої клітинної загибелі нейронів, різноманітні

ушкодження мікросудин, варіативні дегенеративні зміни переважно пірамідних нейронів. У групах тварин з нейрокогнітивним дефіцитом через 20 і 40 діб посттравматичного періоду відбувалось збереження і поглиблення нейродегенеративних процесів, в той час як у тварин групи порівняння спостерігалось поступове зменшення проявів нейрозапалення.

При вивченні зразків грушоподібної кори після нанесення ТЧМТ спостерігались характерні ознаки апоптотичної загибелі значної кількості пірамідних нейронів. Найбільша їх частота відзначалася у тварин з нейрокогнітивним дефіцитом на всіх термінах експерименту. Важливо відзначити, що у тварин першої групи апоптотичний процес у популяції нейронів піріформної кори протягом віддаленого посттравматичного періоду помітно поглиблювався, у той час як у тварин другої експериментальної групи частота апоптозу значно обмежувалась. У шурів групи порівняння інтенсивна апоптотична загибель нейронів спостерігалася через 10 діб після ТЧМТ і в подальшому ставала значно менш вираженою. Некротично змінені нейрони у піріформній корі не виявлялись в жодній групі тварин на всіх досліджуваних термінах після травми. Прояви аутофагії пірамідних нейронів зустрічались в поодиноких спостереженнях в усіх групах шурів; їх частота не залежала від строку посттравматичного періоду.

Морфометричний підрахунок чисельної щільності нейронів всіх типів за допомогою імуногістохімічного визначення експресії β -тубуліну, який використаний для ідентифікації мікротрубочок нейронів, показав різке зменшення загального вмісту клітин у піріформній корі ГМ шурів першої і другої груп через 10 діб після травми – на 41,8% і 41,2% відповідно ($p < 0,05$), в той час як у групі порівняння параметр зменшувався у помірному ступені – на 23,5% ($p < 0,05$). При цьому у першій і другій групах тварин чисельна щільність нейронів коливалась в обмеженому діапазоні на всіх термінах експерименту та статистично вагомо поступалася показнику групи порівняння (табл. 1). Через 20 і 40 діб після ТЧМТ у шурів без нейрокогнітивних розладів спостерігалось поступове ущільнення нейронів і наближення до нормальних значень за рахунок редукції набряку та інших тканинних ознак нейрозапалення. У тварин першої експериментальної групи у віддаленому посттравматичному періоді відбувалось зниження чисельної щільності нейронів відносно показника інтактних тварин: через 20 діб після травми – на 51,0% ($p < 0,05$), через 40 діб – на 56,5% ($p < 0,05$). Така негативна динаміка вмісту нейронів була пов'язана з поглибленням апоптотичного процесу в піріформній корі у тварин даної групи протягом досліджуваного терміну експерименту. У тварин другої групи чисельна щільність нейронів піріформної кори через 20 діб після травми поступалася нормальному рівню на 37,4% ($p < 0,05$),

через 40 діб – на 32,7% ($p < 0,05$), істотно не змінюючись у порівнянні з терміном 10 діб після на-

несення травми, що вказувало на обмеження апоптозу у віддаленому посттравматичному періоді у щурів без порушень пам'яті.

Таблиця 1

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

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	17,1 $\pm$ 1,7 * **	17,3 $\pm$ 1,3 * **	22,5 $\pm$ 2,1 *
20 діб	14,4 $\pm$ 1,2 * **	18,4 $\pm$ 1,5 * **	26,7 $\pm$ 3,2
40 діб	12,8 $\pm$ 1,8 * **	19,8 $\pm$ 1,8 * **	28,2 $\pm$ 2,9

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів ($29,4 \pm 2,3 \times 10^2 \text{ мм}^{-2}$); ** – $p < 0,05$ при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Загальна щільність і морфологія дрібних мультиполярних гетероморфних нейронів зовнішнього шару грушоподібної кори після нанесення ТЧМТ істотно не відрізнялись від інтактної морфології на світлооптичному рівні в усіх досліджуваних групах тварин протягом 40 діб посттравматичного періоду. В окремих випадках через 10 діб після травми спостерігались нейрони з ознаками часткового хроматолізу та редукованими дендритами. Значна частка пірамідних нейронів піріформної кори через 10 діб після моделювання ТЧМТ була представлена ішемічно зміненими нейронами з перикаріомом трикутної форми, щільною темною цитоплазмою, звивистим апікальним дендритом. Також у тварин всіх досліджуваних експериментальних груп зустрічались вакуолізовані нейрони з частковим хроматолізом ядра та лізисом субстанції Ніссля. Через 20 і 40 діб після нанесення травми пірамідні нейрони з обмеженою синтетичною активністю стабільно візуалізувались в корі щурів першої та другої груп, в той час як у тварин без нейрокогнітивного дефіциту ушкоджені пірамідні нейрони виявлялись в істотно меншій кількості.

Морфометричний аналіз показав, що за розмірами пірамідні нейрони істотно не різнились між трьома експериментальними групами, проте суттєво поступались нормальному значенню середнього діаметра перикаріону інтактних щурів (табл. 2). Через 10 діб після травми найбільш істотне зменшення розмірів перикаріонів спостерігалось в першій групі тварин – на 47,9% ($p < 0,05$). У тварин другої групи параметр поступався нормальному рівню на 40,8% ($p < 0,05$), у тварин групи порівняння – на 36,5% ($p < 0,05$). Через 20 діб у тварин першої групи параметр поступався нормі на 36,0% ($p < 0,05$), у тварин другої групи – на 27,7% ($p < 0,05$), у тварин групи порівняння – на 20,5% ($p < 0,05$). Через 40 діб після травми у тварин всіх досліджуваних груп пірамідні нейрони за розмірами не відрізнялись статистично від показника інтактних тварин, що свідчило про поступове відновлення об'єму перикаріона цих клітин наприкінці досліджуваного терміну експерименту незалежно від ступеня нейрокогнітивного дефіциту.

Таблиця 2

Середній діаметр перикаріона пірамідних нейронів грушоподібної кори, мкм ($M \pm m$)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	4,12 $\pm$ 0,43 *	4,68 $\pm$ 0,52 *	5,02 $\pm$ 0,44 *
20 діб	5,06 $\pm$ 0,47 *	5,72 $\pm$ 0,43 *	6,29 $\pm$ 0,51 *
40 діб	6,85 $\pm$ 0,59	6,77 $\pm$ 0,57	6,98 $\pm$ 0,41

Нейронний склад внутрішнього мультиформного шару грушоподібної кори у тварин без нейрокогнітивного дефіциту не відрізнявся від типових нормальних характеристик і містив клітини з переважно незміненою морфологією. У тварин з нейрокогнітивними розладами поряд із поодинокими апоптотично зміненими формами зустрічались численні гіперхромні нейрони із щільними ядрами. Також зустрічались нейрони, які містили ознаки різного ступеня хроматолізу, іноді з

повним зникненням хроматофільної субстанції. Характерним для таких клітин було збільшення перикаріонів, потовщення або деформація відростків, ексцентричне розташування ядер. Будь-яких відмінностей між першою і другою експериментальними групами за морфологією нейронів даного шару піріформної кори протягом посттравматичного періоду не спостерігалось.

Імуногістохімічний аналіз впливу ТЧМТ на синаптичний апарат нейронів грушоподібної

кори у зоні протиудару за допомогою моноклональних антитіл до синаптофізину (p38) виявив різке зниження експресії даного маркера у сірій речовині 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 піріформній корі шурів першої та другої груп суттєво не змінювалась, залишаючись на низькому рівні. У тварин групи порівняння відбувалося часткове відновлення щільності p38-позитивних синапсів протягом посттравматичного періоду.

Імуногістохімічне дослідження синаптичного маркера GAP43, який віддзеркалює регенераторну активність аксонів, показало відсутність GAP43-позитивних структур у грушоподібній корі як у інтактних шурів, так і в групах тварин першої та другої експериментальних груп протягом усього досліджуваного посттравматичного періоду. На відміну від шурів з нейрокогнітивними розладами, у шурів групи порівняння в піріформній корі ГМ через 20 і 40 діб після травми спостерігалась активація експресії GAP43, що свідчило про ремоделювання пресинаптичних терміналей аксонів даної локалізації.

З використанням маркерів CD56 і N-кадгерину було встановлено, що інтенсивність імуногістохімічної мітки на цитолемі нейронів у грушоподібній корі була подібною до характеру експресії цих маркерів на зовнішній мембрані інтактних нейронів. Загальна інтенсивність специфічного забарвлення зрізів була суттєво меншою після травматичного ушкодження ГМ, ніж у інтактних шурів, за рахунок клітинної загибелі значної кількості нейронів. Розподіл CD56-позитивних і N-кадгерин-позитивних нейронів у шурів першої та другої груп не змінювався протягом 40 діб посттравматичного періоду.

Морфологічний аналіз гліального компонента піріформної кори виявив суттєві морфогенетичні перебудови макрогліоцитів за характером їх просторового перерозподілу і за проліферативними властивостями. Через 10 діб після травми у тварин всіх експериментальних груп спостерігалось значне накопичення протоплазматичних астроцитів у перивазальних просторах, в яких зберігався набряк, проте виявлялися мітози гліоцитів. У просторах між мікросудинами візуалізувались варіативні за розмірами та конфігурацією ділянки нейропілія, в яких щільність розташування волокнистих астроцитів була помітно нижчою, ніж в аналогічних ділянках кори інтактних шурів. Після ТЧМТ у цих ділянках виявлялись відокремлені одна від одної клітини з довгими відростками, які не контактували із сусідніми астроцитами. Кількість відростків і ступінь їх розгалуження значно варіювали.

Характерними для мозаїчного міжсудинного астроцитарного дефіциту у складі піріформної

кори були прояви масованої аутофагії гліоцитів. Через 20 і 40 діб посттравматичного періоду у тварин першої і другої груп дослідження осередки гліального дефіциту з поширенням аутофагії астроцитів зберігалися, у той час як у шурів групи порівняння подібні осередки з аутофагією зустрічались лише в поодиноких випадках.

Дослідження міжклітинної інтеграції астроцитів за допомогою поверхневих маркерів CD56 (NCAM1) і N-кадгерину показало нерівномірний розподіл імуногістохімічної мітки в корі грушоподібної кори ГМ тварин у всіх досліджуваних групах. Через 10 діб після травми навколо гемокapілярів спостерігались накопичення протоплазматичних астроцитів, які активно експресували обидва означені маркери на своїй поверхні, в той час як у нейропілі між мікросудинами візуалізувались відокремлені один від одного CD56-негативні і N-кадгерин-негативні волокнисті астроцити. При цьому будь-яких відмінностей між експериментальними групами не спостерігалось. Через 20 і 40 діб у першій групі тварин мозаїчний характер експресії маркерів CD56 і N-кадгерину зберігався, в той час як у тварин другої групи і групи порівняння відбувалося посилення імуногістохімічної мітки обох маркерів на поверхні астроцитів у просторах між мікросудинами та зниження інтенсивності забарвлення клітин поблизу гемокapілярів, що вказувало на відновлення адгезивних властивостей астроглії грушоподібної кори.

Морфометричний аналіз щільності макрогліоцитів за допомогою мітки гліальним маркером GFAP показав, що через 10 діб від початку експерименту чисельна щільність клітин у піріформній корі поступалася нормальному значенню в першій групі тварин на 23,2% ($p < 0,05$), у другій – на 25,4% ($p < 0,05$), у групі порівняння – на 21,5% ($p < 0,05$). Через 20 діб після нанесеної травми у тварин першої експериментальної групи ступінь астроцитарного дефіциту зростає; у тварин другої групи – не змінювався; у тварин групи порівняння – ставав менш виразним у порівнянні з попереднім терміном дослідження (табл. 3). Через 40 діб після ТЧМТ у тварин першої групи параметр поступався показнику інтактних тварин на 36,5% ($p < 0,05$) і показнику групи порівняння на 33,5% ($p < 0,05$). У цей термін у тварин другої групи чисельна щільність макрогліоцитів зростала відносно попереднього терміну спостережень, поступаючи показнику інтактних тварин лише на 13,3% ($p < 0,05$) і не відрізняючись у статистично вагомому ступені від значення у групі порівняння.

Морфологія макрогліального компонента глії значно варіювала у різних шарах грушоподібної кори. Після моделювання ТЧМТ у тварин всіх досліджуваних груп переважна більшість мікрогліоцитів мала сплюснену форму та складно-розгалужені відростки, які занурювались між нейронами або в глибину нейропілія. Мікрогліоцити ку-

лястої форми з поодинокими довгими хвилеподібними відростками, які контактували з елементами ГЕБ, зустрічалися поблизу гемокапілярів. У тварин з нейрокогнітивним дефіцитом, на відміну від щурів групи порівняння, поблизу пірамідних нейронів периваскулярно розташовувались ти-

пові циркулюючі макрофаги та поодинокі лімфоцити, що вказувало на активний запальний процес у багатьох ділянках сірої речовини та було пов'язано з елімінацією апоптотично змінених нейронів після ТЧМТ.

Таблиця 3

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

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	139 $\pm$ 15 *	135 $\pm$ 15 *	142 $\pm$ 16 *
20 діб	121 $\pm$ 11 * **	137 $\pm$ 12 *	157 $\pm$ 11
40 діб	115 $\pm$ 14 * **	157 $\pm$ 13	173 $\pm$ 19

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів ($181 \pm 16 \times 10^2 \text{ мм}^{-2}$); ** – $p < 0,05$ при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

При кількісній оцінці чисельної щільності мікрогліоцитів через 10 діб експерименту у всіх досліджуваних групах тварин спостерігалось різке підвищення параметра у порівнянні з інтактними тваринами: в першій групі – на 86,7% ($p < 0,05$), у другій – на 92,4% ($p < 0,05$), у групі порівняння – на 71,4% ($p < 0,05$). Через 20 діб у тварин першої групи параметр не змінювався відносно попереднього терміну спостережень, перевищуючи норму на 83,8% ($p < 0,05$). У тварин другої групи відбувалось помітне зниження щільності мікрогліоцитів до рівня, що на 65,7% ($p < 0,05$) перевищував

інтактне значення. У тварин групи порівняння спостерігалася найбільш виразна редукція параметра у порівнянні з попереднім терміном: через 40 діб після травми чисельна щільність мікрогліоцитів не відрізнялась статистично від показника інтактних тварин (табл. 4). На відміну від групи порівняння, через 40 діб після ТЧМТ у тварин першої групи параметр перевищував нормальне значення на 76,2% ($p < 0,05$), у тварин другої групи – на 37,1% ($p < 0,05$).

Таблиця 4

Чисельна щільність мікрогліоцитів грушоподібної кори, мм^{-2} ($M \pm m$)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	1,96 $\pm$ 0,30 *	2,02 $\pm$ 0,24 *	1,80 $\pm$ 0,26 *
20 діб	1,93 $\pm$ 0,26 * **	1,74 $\pm$ 0,21 * **	1,33 $\pm$ 0,17 *
40 діб	1,85 $\pm$ 0,32 * **	1,44 $\pm$ 0,16 * **	1,17 $\pm$ 0,14

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів ($1,05 \pm 0,13 \times 10^2 \text{ мм}^{-2}$); ** – $p < 0,05$ при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Вивчення ГМЦР у складі грушоподібної кори ГМ показало, що у першій і другій групах тварин через 10 діб після ТЧМТ відбувалося 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 структурою спостерігалась значна кількість ушкоджених мікросудин, з ознаками стазу і складування еритроцитів, інколи з частково або повністю облітерованим просвітом. За допомогою імуногістохімічного визначення експресії маркера GFAP на зовнішній поверхні ушкоджених капілярів виявлялись нашарування протоплазматичних астроцитів у вигляді щільних муфт. Також виявлялися мікросудини з

ознаками внутрішньосудинного мікротромбозу в оточенні дрібних осередків вторинних крововиливів, з плазматичним просоченням гемокапілярної стінки та периваскулярного простору. Зустрічались поодинокі гемокапіляри з некрозом, деструкцією або фрагментацією ендотеліальної стінки. Крім того, частина гемокапілярів або ендотеліальних тяжів не утворювали сполучення з астроцитами, що свідчило про відсутність ГЕБ.

Через 20 діб після ТЧМТ у піріформній корі щурів першої і другої експериментальних груп зберігалася значна кількість ушкоджених мікросудин, що вказувало на наявність тривалого деструктивного процесу. 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 групи тварин, у другій експериментальній групі протягом віддаленого посттравматичного періоду спостерігалися новоутворені гемокапіляри з повноцінними структурами ГЕБ, а також численні ендотеліальні угруповання та вирости, які вказували на активацію неоваскулогенезу. На відміну від першої і другої експериментальних груп, у тварин групи порівняння uszkodжені мікросудини в оточенні астроцитарних конгломератів у складі грушоподібної кори зустрічались у значно меншій кількості. 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 uszkodжених гемокапілярів помітно зменшувалась відносно попереднього терміну спостережень.

Морфометричне вивчення мікросудин піріформної кори показало, що через 10 діб після ТЧМТ сумарна чисельна щільність неушкоджених і патологічно змінених мікросудин у тварин першої групи на 45,1% ($p < 0,05$) перевищувала нормальне значення, другої групи – на 54,4% ($p < 0,05$), групи порівняння – на 53,0% ($p < 0,05$). Через 20 діб від початку експерименту чисельна щільність мікросудин у тварин з нейрокогнітивним дефіцитом суттєво не змінювалась відносно рівня на попередньому терміні експерименту, в той час як у тварин групи порівняння параметр значно знижувався і повертався до нормального рівня (табл. 5). Через 40 діб після ТЧМТ у всіх тварин спостерігалась нормалізація сумарної чисельної щільності кровоносних мікросудин, хоча співвідношення між uszkodженими, нормальними і новоутвореними гемокапілярами суттєво різнилося в трьох експериментальних групах і залежало від ступеня нейрокогнітивного дефіциту.

Таблиця 5

Чисельна щільність гемокапілярів грушоподібної кори, мм^{-2} ($M \pm m$)

Термін після травми	Групи дослідження		
	Перша	Друга	Порівняння
10 діб	$76,3 \pm 9,6^*$	$81,2 \pm 11,9^*$	$80,5 \pm 10,7^*$
20 діб	$71,8 \pm 8,7^{***}$	$78,4 \pm 8,1^{***}$	$57,3 \pm 5,5$
40 діб	$61,8 \pm 9,5$	$63,2 \pm 8,3$	$54,8 \pm 8,2$

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні зі значенням у групі інтактних щурів ($52,6 \pm 6,4 \text{ мм}^{-2}$); ** – $p < 0,05$ при порівнянні з відповідним за терміном значенням у групі порівняння.

Обговорення

Черепно-мозкова травма викликає складний набір первинних і вторинних реакцій, які uszkodжують ділянки мозку, що обслуговують певні когнітивні функції. Вогнищеві uszkodження викликають стійкі когнітивні порушення, типи яких відносно нескладно зрозуміти на основі сучасних нейроанатомічних уявлень [27]. Крім того, uszkodження аксонів у поєднанні з цитотоксичними процесами є найпоширенішою патоморфологічною причиною посттравматичних когнітивних порушень і мають найбільший вплив на швидкість та ефективність обробки інформації [10, 12]. У цьому відношенні викликають інтерес конкретні топологічні особливості структурних перебудов різних відділів ГМ, які відбуваються протягом віддаленого посттравматичного періоду і пов'язані з характером нейрокогнітивних розладів.

У нашому дослідженні проаналізовані оборотні та стабільні морфологічні зміни в грушоподібній корі ГМ щурів протягом 40 діб після нанесення стандартизованої симетричної тяжкої ЧМТ в моделі ударного прискорення. Показано, що нейрокогнітивні розлади з порушеннями пам'яті у віддаленому періоді після ТЧМТ супроводжуються поглибленням дегенерації нейронів і

хронізацією нейрозапалення з активацією механізмів апоптозу нейронів і аутофагії гліоцитів.

За результатами проведеного імуногістохімічного дослідження виявлено, що пригнічена експресія синаптофізину у грушоподібній корі щурів з нейрокогнітивними розладами через 20 і 40 діб після ЧМТ суттєво не змінюється та залишається на низькому рівні. У тварин групи порівняння відбувається відновлення щільності р38-позитивних синапсів протягом посттравматичного періоду. Через 10 діб після ЧМТ у піріформній корі тварин всіх груп спостерігається помірне накопичення CD56- і N-кадгерин-позитивних 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. Прогресування нейродегенерації супроводжується активацією мікроглії і призводить до дезінтеграції та міграції макрогліоцитів з формуванням незворотнього мозаїчного астроцитарного дефіциту і утворенням гліальних нашарувань у вигляді муфт навколо гемокапілярів.

Отримані нами дані кількісно характеризують

ють та пояснюють численні відомості наукової літератури про те, що деструкція та напруження аксонів викликає різке підвищення рівня більшості церебральних нейромедіаторів, причому травматично індукований надлишок глутамату та ацетилхоліну є найбільш нейротоксичним [15]. Деструктивні наслідки такого надлишку нейромедіаторів виявляються найбільшими в тих областях, де ці нейромедіатори локалізовані сумісно – в структурах енторинально-гіпокампального комплексу, базальному відділі та корі переднього мозку.

Заслугує на увагу той факт, що після ЧМТ запальна реакція, токсичність глутамату і активація апоптотичних процесів спричиняють масовану вторинну загибель нейронів, тим часом приводячи до нейродегенерації, що обумовлює поглиблення когнітивних порушень [3-5, 28, 29]. У нашому дослідженні показано, що у зоні протиудару в застосованій моделі ТЧМТ у тварин з нейрокогнітивними розладами спостерігається значне зростання кількості новоутворених гемокапілярів з типовою будовою ендотеліальної стінки, проте на поверхні окремих ушкоджених капілярів виявляється велика кількість щільно упакованих протоплазматичних астроцитів. Збереження функції пам'яті у тварин з нейрокогнітивними розладами пов'язано з обмеженням вторинної загибелі нейронів і стабілізацією адгезивних властивостей астроглії, що запобігає утворенню астроцитарних муфт навколо новоутворених гемокапілярів при збереженні цілісності ГЕБ.

У тварин без нейрокогнітивних розладів у віддаленому посттравматичному періоді в грушоподібній корі компенсаторні механізми реалізуються через ефективний неоваскулогенез, обмеження периваскулярної гіперплазії астроцитів і нейрозапалення, що запобігає загибелі нейронів і призводить до активації синаптичного ремоделювання.

Висновки

1. Нейрокогнітивні розлади з порушеннями пам'яті у віддаленому періоді після ТЧМТ супро-

воджуються поглибленням дегенерації нейроцитів і хронізацією нейрозапалення з активацією механізмів апоптозу нейронів і аутофагії гліоцитів.

2. Прогресування нейродегенерації супроводжується активацією мікроглії і призводить до дезінтеграції та міграції макрогліоцитів з формуванням незворотнього мозаїчного астроцитарного дефіциту і утворенням гліальних нашарувань у вигляді муфт навколо гемокапілярів.

3. Збереження функції пам'яті у тварин з нейрокогнітивними розладами пов'язано з обмеженням вторинної загибелі нейронів і стабілізацією адгезивних властивостей астроглії грушоподібної кори, що запобігає утворенню астроцитарних муфт навколо новоутворених гемокапілярів при збереженні цілісності ГЕБ.

4. У тварин без нейрокогнітивних розладів у віддаленому посттравматичному періоді в грушоподібній корі компенсаторні механізми реалізуються через ефективний неоваскулогенез, обмеження периваскулярної гіперплазії астроцитів і нейрозапалення, що запобігає загибелі нейронів і призводить до активації синаптичного ремоделювання.

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 перебувань 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. 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
4. 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
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-
berg 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. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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

14. 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.

15. 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.

16. Foda MA, Marmarou A. A new model of dif-

fuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg*. 1994;80(2):301-313. doi:10.3171/jns.1994.80.2.0301

17. 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

18. Bureš J, Burešová O, Huston JP. Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. Second edition. Amsterdam – New York : Elsevier science publishers BV; 2016. 326 p.

19. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg : Council of Europe. 1986;123:52.

20. 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. *Off J Eur Union*. 2010;53(L276):33-79.

21. Mulish M, Welsh U. (Eds.). *Romeis Mikroskopische technic*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag; 2010. 551 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2254-5>

22. Suvana SK, Layton C, Bancroft GD. (Eds.). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 8th Edition. Elsevier; 2019. 558 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6864-5.00008-6>

23. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:289-98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

24. Nguyen T. *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices*. Cambridge : Cambridge University Press; 2022. 272 p.

25. Poslavska, OV. [Determination of linear dimensions and areas of individual morphological objects on photomicrographs using the ImageJ program]. *Morphologia*. 2016;10(3):377-81.

26. Hruziova TS, Lekhan VM, Ohniev VA, Haliienko LI, Kriachkova LV, Palamar BI. [Biostatistics]. *Vinnytsia : New Book*; 2020. 384 p.

27. 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):5291-323. doi: 10.1002/cphy.c230007

28. 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

29. 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.

Мізякіна К.В. Морфологічна характеристика грушоподібної кори у щурів з різними нейрокогнітивними розладами після черепно-мозкової травми.

РЕФЕРАТ. Актуальність. У вирішенні численних питань, пов'язаних із лікуванням та реабілітацією пацієнтів з травматичним ушкодженням головного мозку, особливий інтерес представляє вивчення патоморфологічних механізмів, які визначають характер формування та динаміки нейрокогнітивних порушень у різні терміни після травми. **Метою** дослідження було визначення тканинних і клітинних посттравматичних змін структури грушоподібної кори головного мозку щурів з різними нейрокогнітивними розладами у різні терміни після тяжкої черепно-мозкової травми. **Методи.** Для відтворення тяжкої черепно-мозкової травми у щурів застосовували «модель ударного прискорення». За результатами неврологічних тестів щури були розподілені на три групи: 1) перша – тварини після травми з нейрокогнітивними розладами і порушеннями пам'яті; 2) друга – тварини після травми з нейрокогнітивними розладами без порушень пам'яті; 3) група порівняння – тварини після травми без нейрокогнітивних розладів. Проводили гістологічне, морфометричне та імуногістохімічне дослідження грушоподібної кори з використанням маркерів β -tubulin, Synaptophysin, GAP43, NCAM1, N-cadherin, GFAP. **Результати та підсумок.** Нейрокогнітивні розлади з порушеннями пам'яті у віддаленому періоді після ТЧМТ супроводжуються поглибленням дегенерації нейронів грушоподібної кори і хронізацією нейрозапалення з активацією механізмів апоптозу нейронів і аутофагії гліоцитів. Прогресування нейродегенерації супроводжується активацією мікроглії і призводить до дезінтеграції та міграції макрогліоцитів з формуванням незворотнього мозаїчного астроцитарного дефіциту і утворенням гліальних нашарувань у вигляді муфт навколо гемокапілярів. Збереження функції пам'яті у тварин з нейрокогнітивними розладами пов'язано з обмеженням вторинної загибелі нейронів і стабілізацією адгезивних властивостей астроглії грушоподібної кори, що запобігає утворенню астроцитарних муфт навколо новоутворених гемокапілярів при збереженні цілісності гемато-енцефалічного бар'єру. У тварин без нейрокогнітивних розладів у віддаленому посттравматичному періоді в грушоподібній корі компенсаторні механізми реалізуються через ефективний неоваскулогенез, обмеження периваскулярної гіперплазії астроцитів і нейрозапалення, що запобігає загибелі нейронів і призводить до активації синаптичного ремоделювання.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, щури, нейрокогнітивні розлади, грушоподібна кора, морфологія.