

Національна академія наук України
Інститут фізіології імені О. О. Богомольця

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Забенько Єлизавета Юріївна

УДК 616.831-001.34:612.826:616.8-003.98:574.814.5

ДИСЕРТАЦІЯ

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ МИШЕЙ ПІСЛЯ ПОВТОРЮВАНОЇ ЛЕГКОЇ ЧЕРЕПНО- МОЗКОВОЇ ТРАВМИ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ КОРВІТИНОМ

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело Забенько Є.Ю. _____

Науковий керівник: **Півнева Тетяна Андріївна**,
доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Забенько Є. Ю. Морфофункціональні зміни в головному мозку мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми та їх корекція корвітином. – Рукопис

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Робота присвячена визначенню морфофункціональних характеристик головного мозку мишей у моделі повторюваної легкої черепно-мозкової травми, а також впливу на них антиоксидантного препарату корвітину, який є водорозчинною формою біофлавоноїду кверцетину. Було деталізовано і доповнено дані щодо змін поведінкових характеристик і таких, які відбувалися у структурі головного мозку, зокрема було вперше показано зростання кількості «темних» нейронів при даному різновиді механічного пошкодження. Вперше наведено дані про ефективність фармакологічної корекції наслідків повторюваної легкої черепно-мозкової травми корвітином.

За епідеміологічними та посмертними гістологічними даними, наявність легкої черепно-мозкової травми в історії хвороби підвищує ризик розвитку пізніх нейродегенеративних наслідків (хронічна травматична енцефалопатія, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона тощо), особливо за повторних випадків. Однак стандартні прижиттєві методи діагностики (магнітно-резонансна томографія, комп'ютерна томографія, електронцефалографія) наразі є недостатньо чутливими для виявлення наслідків даного різновиду травми на ранніх стадіях. З цієї причини заходи щодо їх лікування та профілактики залишаються обмеженими. У зв'язку з цим ми поставили мету визначити морфофункціональні характеристики головного мозку при

експериментальній повторюваній легкій черепно-мозковій травмі, а також вплив наступного введення корвітину на дані параметри у травмованих мишей.

Ми здійснили аналіз змін у поведінкових характеристиках і структурі головного мозку мишей після відтворення повторюваної легкої черепно-мозкової травми згідно з модифікацією моделі вільного падіння вантажу, запропонованою Kane et al, 2012. Пошкодження наносили протягом 5 днів (1 удар/день) після інгаляційної наркотизації диетиловим ефіром. Маса вантажу становила 95 г. Його спускали з висоти 1 м. Оскільки отримані дані свідчили про зміни нейронної структури та розвиток запальних процесів навіть через короткі проміжки часу після механічного пошкодження, травмованим мишам протягом 5 днів інтраперитонеально вводили препарат корвітин. Доза корвітину становила 100 мг/кг (кверцетину – 10 мг/кг). Схема введення препарату була наступною: день 1 та 2 – дві дози з інтервалом у 6 год, день 3-5 – одна доза щоденно. Ефективність кверцетину було показано рядом дослідників у моделях ішемії головного мозку, спинномозкової та черепно-мозкової травм тощо. Відомо про його антиоксидантну дію, яка полягає у нейтралізації вільних радикалів, що виділяються під час вторинного пошкодження при черепно-мозковій травмі.

Поведінкові зміни вивчали за допомогою тестів у «Відкритому полі» та Т-лабіринті. У «Відкритому полі» протягом 30 хв оцінювали рівень локомоторної активності, тривалість відпочинку, інтенсивність грумінгу та кількість актів дефекації. Т-лабіринт використовували для визначення рівня тривожності та здатності до просторової орієнтації, тобто параметрів, безпосередньо пов'язаних із функцією гіпокампа, відповідно до методики спонтанного чергування виборів (*spontaneous alternation*). Морфологічні наслідки повторюваної легкої черепно-мозкової травми та наступного введення корвітину оцінювали за допомогою конфокальної скануючої та

електронної мікроскопії у СА1-зоні гіпокампа, оскільки дана структура головного мозку відома своєю чутливістю до порушень центральної нервової системи.

Безпосередньо після кожного удару у наркотизованих експериментальних тварин вимірювали латентний період рефлексу випрямлення, який достовірно зростав, порівняно з контрольними значеннями, отже нанесення механічного пошкодження призводило до порушення неврологічного стану.

При проведенні поведінкових тестів у мишей після травми спостерігали зростання тривалості відпочинку (контроль – 1010.63 ± 54.37 , день 5 – 1298.60 ± 54.37 , день 10 – 1167.00 ± 78.56 , день 30 – 1118.63 ± 132.04) і рівня тривожності за кількістю актів дефекації (контроль – 5.13 ± 0.67 , день 5 – 3.90 ± 0.57 , день 10 – 6.67 ± 0.91 , день 30 – 5.38 ± 0.60) порівняно з контролем. Також знижувався рівень локомоторної активності, який визначали за кількістю перетнутих ліній у «Відкритому полі» (контроль – 426.63 ± 34.36 , день 5 – 268.50 ± 37.73 , день 10 – 324.44 ± 54.35 , день 30 – 374.13 ± 96.40). Значущі статистичні відмінності було знайдено лише у показниках тривалості відпочинку та кількості актів дефекації. Останній показник вважається корелятом тривоги та страху. Після введення корвітину значення поведінкових параметрів наближалися до таких у контролі. У Т-лабіринті вивчали зміни здатності до просторової орієнтації та рівня тривожності, однак істотних відмінностей у порівнянні з контрольними значеннями після травми та введення корвітину помічено не було.

Після повторюваної легкої черепно-мозкової травми не спостерігали ознак переломів черепа, набряку та крововиливу у головному мозку. Наявність набряку перевіряли, порівнюючи відносний вміст рідини у головному мозку контрольних і травмованих мишей через 4 год після останнього удару. Відмінностей знайдено не було. Отже дане

пошкодження не відповідало тяжкому. Водночас, за результатами імуногістохімічного аналізу СА1-зони гіпокампа, механічне пошкодження супроводжувалося розвитком астро- та мікрогліозу. Зростала кількість астроцитів (контроль – 19.44 ± 1.05 , день 5 – 37.55 ± 1.76 , день 10 – 45.36 ± 2.04 , день 30 – 44.54 ± 1.92) і клітин мікроглії (контроль – 22.40 ± 0.74 , день 5 – 48.00 ± 2.12 , день 10 – 45.29 ± 1.89 , день 30 – 40.63 ± 2.04), крім цього, ці клітини зазнавали гіпертрофії, тобто у тканинах головного мозку травмованих мишей мали місце запальні процеси. Астроцити та клітини мікроглії відіграють змішану роль при патологічних процесах у головному мозку, і сприяючи регенерації тканин, і стимулюючи процеси запалення.

Крім цього, у препаратах, забарвлених метиленовим синім, відбулося збільшення кількості «темних» нейронів пірамідного шару (контроль – 0.57 ± 0.25 , день 5 – 5.17 ± 1.24), а електронномікроскопічні зразки містили електроннощільні нейрони в тій же ділянці, що свідчить про їх можливе становлення на шлях загибелі. Імуногістохімічний аналіз кількості пірамідних нейронів у СА1-зоні гіпокампа в контролі та після повторюваної легкої черепно-мозкової травми відмінностей не показав.

Введення корвітину травмованим експериментальним тваринам призвело до гальмування процесів гліозу, що проявлялося у зниженні кількості астроцитів (день 5 – 35.82 ± 1.43 , день 30 – 19.77 ± 0.89) та клітин мікроглії (день 5 – 37.89 ± 1.65 , день 30 – 27.18 ± 1.16), однак форма цих клітин залишалася дещо гіпертрофованою. Відповідно, ін'єкції корвітину травмованим мишам призводили до достовірного зниження інтенсивності астро- та мікрогліозу, однак залишаються необхідними подальші дослідження для пошуку найбільш ефективної схеми введення даного препарату.

Таким чином, в роботі показано наявність морфофункціональних змін у головному мозку після повторюваної легкої черепно-мозкової травми навіть через короткі проміжки часу після її відтворення. Вперше

продемонстровано збільшення кількості темних нейронів у пірамідному шарі CA1-зони гіпокампа при даному різновиді пошкодження. Травма супроводжувалася запальними процесами у вигляді астро- та мікрогліозу, до гальмування яких призвело введення корвітину. Крім цього, після ін'єкцій препарату мало місце наближення поведінкових характеристик до контрольних значень. Отже, корвітин показав виражену протизапальну та нейропротективну дію при повторюваній легкій черепно-мозковій травмі.

Ключові слова: головний мозок, CA1-зона гіпокампа, повторювана легка черепно-мозкова травма, нейрони, астроцити, клітини мікроглії.

SUMMARY

Zabenko Y. Y. Morphofunctional changes in brain of mice after repetitive mild traumatic brain injury and their correction with corviline. – Manuscript

A dissertation is submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty – 03.00.13 – Human and animal physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, 2020.

The work is devoted to determining morphofunctional characteristics of the brain of mice in a model of repetitive mild traumatic brain injury, as well as the effect of antioxidant drug corvitolin, which is a water-soluble form of bioflavonoid quercetin. Data on changes in behavioral characteristics and those that occurred in the structure of the brain were detailed and supplemented, in particular, an increase in the number of "dark" neurons at this type of mechanical damage was shown for the first time. For the first time, data on effectiveness of pharmacological correction of the consequences of repetitive mild traumatic brain injury with corvitolin were presented.

According to epidemiological and postmortem histological data, presence of mild traumatic brain injury in the history of disease increases the risk of late neurodegenerative consequences (chronic traumatic encephalopathy, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, etc), especially in recurrent cases. However, standard diagnostic methods (magnetic resonance imaging, computed tomography, electroencephalography) are currently not sensitive enough to detect the effects of this type of injury in early stages. For this reason, measures for their treatment and prevention remain limited. In this regard, we aimed to determine the morphofunctional characteristics of the brain at experimental repetitive mild traumatic brain injury, as well as the effect of subsequent administration of corvutin on these parameters in injured mice.

We analyzed changes in behavioral characteristics and brain structure of mice after reproduction of repetitive mild traumatic brain injury according to a modification of weight-drop model proposed by Kane et al, 2012. Injury was imposed for 5 days (1 stroke/day) after inhalation anesthesia with diethyl ether. The weight of the load was 95 g. It fell from a height of 1 m. Since the data showed changes in neuronal structure and development of inflammatory processes, even shortly after mechanical damage, injured mice were intraperitoneally administered with corvutin for 5 days. The dose of corvutin was 100 mg/kg (quercetin – 10 mg/kg). The schedule of drug administration was as follows: day 1 and 2 – two doses with an interval of 6 hours, day 3-5 – one dose daily. The effectiveness of quercetin has been shown by a number of researchers in models of cerebral ischemia, spinal cord and traumatic brain injuries, etc. It is known for its antioxidant effect, which is to neutralize free radicals released during secondary damage at traumatic brain injury.

Behavioral changes were studied using tests in "Open Field" and T-maze. The level of locomotor activity, duration of rest, intensity of grooming and the number of acts of defecation were assessed in the "Open Field" for 30 minutes. T-maze was used to determine the level of anxiety and the ability to spatial

orientation (parameters directly related to hippocampal function) according to the method of spontaneous alternation. Morphological consequences of repetitive mild traumatic brain injury and subsequent administration of corvitin were assessed with confocal scanning and electron microscopy in CA1 zone of hippocampus, as this brain structure is known for its sensitivity to central nervous system disorders.

Immediately after each injury, the latent period of righting reflex was measured in anesthetized experimental animals, which significantly increased compared to control values, so infliction of mechanical damage led to an alteration of the neurological state.

When conducting behavioral tests in mice after injury, an increase in the duration of rest was observed (control – 1010.63 ± 54.37 , day 5 – 1298.60 ± 54.37 , day 10 – 1167.00 ± 78.56 , day 30 – 1118.63 ± 132.04) and the level of anxiety by the number of acts of defecation (day 5 – 3.90 ± 0.57 , day 10 – 6.67 ± 0.91 , day 30 – 5.38 ± 0.60) compared with the control (5.13 ± 0.67). The level of locomotor activity also decreased, which was determined by the number of crossed lines in "Open Field" (control – 426.63 ± 34.36 , day 5 – 268.50 ± 37.73 , day 10 – 324.44 ± 54.35 , day 30 – 374.13 ± 96.40). Significant statistical differences were found only in the indicators of rest duration and the number of acts of defecation. The latter indicator is considered a correlate of anxiety and fear. After administration of corvitin, the values of behavioral parameters approached those in control. Changes in ability to spatial orientation and anxiety were studied in T-maze, but no significant differences were observed compared with controls after injury and corvitin administration.

No signs of skull fractures, edema, and cerebral hemorrhage were observed after repetitive mild traumatic brain injury. The presence of edema was checked by comparing relative fluid content in the brains of controls and injured mice 4 h after the last injury. No differences were found. Therefore, this damage did not correspond to severe. At the same time, according to the results of

immunohistochemical analysis of CA1 zone of hippocampus, mechanical damage was accompanied with the development of astro- and microgliosis. The number of astrocytes (control – 19.44 ± 1.05 , day 5 – 37.55 ± 1.76 , day 10 – 45.36 ± 2.04 , day 30 – 44.54 ± 1.92) and microglia cells (control – 22.40 ± 0.74 , day 5 – 48.00 ± 2.12 , day 10 – 45.29 ± 1.89 , day 30 – 40.63 ± 2.04) increased, in addition, these cells underwent hypertrophy, ie in brain tissues of injured mice there were inflammatory processes. Astrocytes and microglia cells play a mixed role in pathological processes in the brain, both promoting tissue regeneration and stimulating inflammatory processes.

In addition, in the samples stained with methylene blue, there was an increase in the number of "dark" neurons of pyramidal layer (control – 0.57 ± 0.25 , day 5 – 5.17 ± 1.24), and electron microscopic samples contained electron-dense neurons in the same area, indicating their possible becoming on the path of death. Immunohistochemical analysis of the number of pyramidal neurons in CA1 zone of hippocampus in the control and after repetitive mild traumatic brain injury showed no differences.

Administration of corvitin to injured experimental animals led to inhibition of gliosis processes, which was shown in the number of astrocytes (day 5 – 35.82 ± 1.43 , day 30 – 19.77 ± 0.89) and microglia cells (day 5 – 37.89 ± 1.65 , day 30 – 27.18 ± 1.16), however, the shape of these cells remained somewhat hypertrophied. Accordingly, injections of corvitin in injured mice led to a significant reduction in the intensity of astro- and microgliosis, however, further studies are needed to find the most effective regimen of this drug.

Thus, the work shows the presence of morphofunctional changes in the brain after repetitive mild traumatic brain injury, even at short intervals after its reproduction. For the first time, an increase in the number of dark neurons in pyramidal layer of CA1 zone of hippocampus was demonstrated in this type of damage. The injury was accompanied by inflammatory processes in the form of astro- and microgliosis, which was inhibited with corvitin administration. In

addition, after injection of the drug, the behavioral characteristics approached control values. Thus, corvitin showed a pronounced anti-inflammatory and neuroprotective effect at repetitive mild traumatic brain injury.

Key words: brain, CA1-zone of hippocampus, repetitive mild traumatic brain injury, neurons, astrocytes, microglia cells.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Zabenko Y. Y., Pivneva T. A. (2014). Behavioral reactions and structural alterations of hippocampal tissue after repetitive mild traumatic brain injury in mice. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia*, 59(2), 63-71. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).
2. Забенько Є. Ю., Півнева Т. А. (2015). Вплив повторної легкої черепно-мозкової травми на поведінку мишей у «Відкритому полі». *Світ медицини та біології*, 1(48), 122-125. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, і підготовці матеріалів статті до публікації).
3. Zabenko Y. Y., Pivneva T. A. (2016). Flavonoid quercetin reduces gliosis after repetitive mild traumatic brain injury in mice. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 62(5), 50-57. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, і підготовці матеріалів статті до публікації).
4. Забенько Є. Ю., Атамас А. В., Півнева Т. А. (2017). Легка черепно-мозкова травма: загальна характеристика, нейродегенеративні наслідки та моделювання. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 63(3), 80-89.

(Особистий внесок здобувача полягає у аналізі наукової літератури та формулюванні висновків щодо сучасного стану проблеми).

5. Чайка А. В., Забенько Е. Ю., Лабунец И. Ф., Пивнева Т. А. (2017). Черено-мозговая травма: патогенез, экспериментальные модели, перспективы клеточной терапии. *Клітинна та органна трансплантологія*, 5(2), 200-216. *(Особистий внесок здобувача полягає у аналізі наукової літератури).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Забенько Є. Ю., Пивнева Т. А. (2013). Модель повторюваної травми головного мозку для вибору потенційних методів лікування. *Physiology: from Molecules to Organism*, Kyiv, Ukraine, October 24-25, 34-35. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
2. Zabenko Y., Pivneva T. (2014). Structural changes of hippocampal CA1 zone in a mouse model of repetitive mild traumatic brain injury. *Young Researchers in BioSciences*, Cluj-Napoca, Romania, July 23-27, 44. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
3. Zabenko Y., Pivneva T. (2015). Effects of repetitive mild brain trauma on behaviour and hippocampal structure in mice. *Conference for Young Scientists*, Kyiv, Ukraine, September 21-25, 135. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
4. Забенько Є. Ю., Атамас А. В., Пивнева Т. А. (2016). Вплив корвітину на процеси гліюзу в СА1 зоні гіпокампа при повторюваній легкій черепно-мозковій травмі в мишей. *XII Національна школа молодих вчених-фармакологів ім. Академіка НАМН України О. В. Стефанова*, Київ, Україна, 12 жовтня. *Публікація тез, усна доповідь.*

5. Забенько Є. Ю., Півнева Т. А. (2017). Введення кверцетину призводить до зменшення гліюзу в моделі повторюваної легкої черепно-мозкової травми у мишей. *VIII Конгрес Українського товариства нейронаук*, Київ, Україна, 7-11 червня, 85-86. *Публікація тез, усна доповідь.*
6. Лабунец І. Ф., Родниченко А. Е., Утко Н. А., Чайковский Ю. Б., Мельник Н. А., Півнева Т. А., Савосько С. І., Забенько Е. Ю., Демидчук А. С., Шамало С. Н., Копьяк Б. С., Сагач В. Ф., Бутенко Г. М. (2017) “Нейропротекторное влияние мелатонина при экспериментальных моделях патологии нервной системы: возможные механизмы. *Клітинна та органна трансплантологія*, 5(2), 41 (Науково-практична конференція з міжнародною участю "Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині, Київ, Україна, 9-10 листопада). *Публікація тез.*
7. Labunets I., Rodnichenko A., Utko N., Chaikovsky Y., Melnyk N., Pivneva T., Savosko S., Zabenko Y., Demydchuk A., Shamalo S., Кор'як В., Сагач В., Бутенко Г. (2018). Neuroprotective effect of melatonin in experimental models of the nervous system pathologies. *Abstracts of 2nd neurology and rehabilitation international symposium “Neuroregeneration” to commemorate prof. Oleksandr Chernyakhivsky*, Kyiv, Ukraine, October 5, 2018, 14-15. *Публікація тез.*

ЗМІСТ

ЗМІСТ	14
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ	19
Актуальність теми	19
Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.....	21
Мета дослідження	21
Задачі дослідження.	21
Наукова новизна одержаних результатів	22
Теоретичне та практичне значення одержаних результатів	23
Особистий внесок здобувача	23
Апробація результатів дисертації	24
Публікації	24
Структура та обсяг дисертації	25
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1. Біомеханіка легкої черепно-мозкової травми	28
1.2. Події каскаду черепно-мозкової травми	29
1.3. Класифікація черепно-мозкових травм.....	32
1.4. Нейродегенеративні патології як наслідок легкої черепно-мозкової травми	33
1.5. Легка черепно-мозкова травма як фактор ризику у розвитку епілепсії	35
1.6. Експериментальні моделі черепно-мозкової травми.....	36

1.7. Біофлавоноїди як потенційний засіб корекції наслідків повторюваної легкої черепно-мозкової травми.....	42
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	47
2.1. Тварини.....	47
2.2. Модель повторюваної легкої черепно-мозкової травми	47
2.3. Введення корвітину.....	49
2.4. Оцінка неврологічного стану та поведінкові тести	49
2.4.1. Відновлення рефлексу випрямлення.....	50
2.4.2. Поведінковий тест «Відкрите поле»	50
2.4.3. Поведінковий тест «Т-лабіринт».....	52
2.5. Визначення ознак набряку.....	54
2.6. Гістологічний, електронномікроскопічний та імуногістохімічний аналіз.....	54
2.6.1. Транскардіальна перфузія мишей	55
2.6.2. Гістологічне забарвлення напівтонких зрізів	56
2.6.3. Трансмісійна електронна мікроскопія	57
2.6.4. Імуногістохімічне забарвлення та обробка зображень	58
2.7. Статистичний аналіз	60
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ	61
3.1. Морфофункціональні зміни в головному мозку мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми.....	61
3.1.1. Відновлення рефлексу випрямлення (righting reflex).....	61
3.1.2. Поведінкові тести у «Відкритому полі».....	62
3.1.3. Поведінковий тест у Т-лабіринті.....	64

3.1.4. Виявлення ознак набряку головного мозку	65
3.1.5. Характеристика нейронів у зрізах головного мозку після гістологічного забарвлення метиленовим синім	66
3.1.6. Характеристика нейронів у електронномікроскопічних зразках	68
3.1.7. Характеристика нейронів у зразках після імуногістохімічного забарвлення	69
3.1.8. Характеристика астроцитів і клітин мікроглії у зразках після імуногістохімічного забарвлення	70
3.2. Корекція морфофункціональних змін в головному мозку мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми корвітином	72
3.2.1. Поведінкові тести у «Відкритому полі»	72
3.2.2. Поведінковий тест у Т-лабіринті	75
3.2.3. Характеристика астроцитів і клітин мікроглії у зразках після імуногістохімічного забарвлення	76
РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	80
4.1. Модель повторюваної легкої черепно-мозкової травми	81
4.2. Нейрологічний стан та поведінкові зміни у мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми	83
4.2.1. Відновлення рефлексу випрямлення	83
4.2.2. Результати поведінкових тестів у «Відкритому полі» і Т-лабіринті	85
4.3. Морфологічні зміни у головному мозку мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми	88
4.3.1. Структурні зміни пірамідних нейронів гіпокампальної СА1-зони мишей після повторюваної легкої ЧМТ	89

4.3.2. Астро- та мікрогліоз у СА1-зоні гіпокампа мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми.....	91
4.4. Нейропротективний ефект корвітину при повторюваній легкій черепно-мозковій травмі у мишей	93
4.4.1. Механізм дії кверцетину при порушеннях центральної нервової системи	94
4.4.2. Поведінкові характеристики мишей після введення корвітину у моделі повторюваної легкої черепно-мозкової травми	96
4.4.3. Гальмування астро- та мікрогліозу у СА1-зоні гіпокампа мишей після введення корвітину у моделі повторюваної легкої черепно-мозкової травми	98
4.5. Перспективи діагностики легкої черепно-мозкової травми	102
4.5.1. Біомаркери крові та спинномозкової рідини	103
4.5.2. τ -білок як біомаркер легкої черепно-мозкової травми та позитронно-емісійна томографія.....	105
4.5.3. Дифузійна тензорна томографія	107
ВИСНОВКИ	109
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	111
ДОДАТОК 1. СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	131

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

GCS	– Glasgow Coma Scale
GFAP	– glial fibrillary acidic protein (гліальний фібрилярний кислий білок)
Iba1	– ionized calcium-binding adapter molecule 1 (йонізована кальцій-зв'язуюча молекула-адаптер 1)
NeuN	– neuronal nuclei (нейронні ядра)
NSS	– Neurological Severity Score
ЦНС	– центральна нервова система
ЧМТ	– черепно-мозкова травма

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми

Згідно з визначенням Центру з контролю та профілактики захворювань [1], черепно-мозкова травма (ЧМТ) зумовлена зіткненням, ударом, струсом або проникним пораненням голови, які порушують нормальне функціонування головного мозку. Легка ЧМТ зумовлена закритим ушкодженням голови внаслідок дії прискорення або гальмування, які призводять до проявів одного або декількох наступних симптомів [2]: 1) тимчасової втрати орієнтації; 2) втрати свідомості на 0–30 хв; 3) судомного нападу (seizure) одразу після травми; 4) серед немовлят та малих дітей – підвищеної збудливості, летаргії або блювоти; 5) серед старших дітей та дорослих – головного болю, запаморочення, підвищеної збудливості, втоми або зниження психологічної концентрації. Причиною легкої ЧМТ можуть бути падіння, дорожньо-транспортні пригоди, епізоди фізичного насилля, заняття контактними видами спорту (футбол, бокс, хокей тощо), участь у воєнних діях [3].

Легка ЧМТ не становить прямої загрози для життя, проте може мати пізні наслідки при повторних випадках, наприклад, підвищення ризику розвитку хронічної травматичної енцефалопатії, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона та ін [4–6]. Тканинні та клітинні зміни при легкій ЧМТ є малодослідженими з-за відсутності достатньо чутливих прижиттєвих методів діагностики. Відповідно, фармакологічні засоби впливу на наслідки поодиноких або повторних випадків легкої ЧМТ залишаються нерозробленими.

Легка ЧМТ складає 80% всіх випадків ЧМТ. Основними групами її ризику є учасники воєнних подій та спортсмени, особливо у контактних

видах спорту (бокс, американський футбол, хокей тощо) [7, 8]. Саме у другій групі ризику було виявлено, що повторюваність легкої ЧМТ сприяє відстроченому розвитку нейродегенеративних захворювань, тоді як цей різновид травми, особливо при поодиноких випадках, не вважався серйозною патологією [9].

Результати гістологічних досліджень *post mortem* засвідчили, що навіть при відсутності відхилень у прижиттєвих результатах магнітно-резонансної томографії, електроенцефалографії та комп'ютерної томографії легкі ЧМТ супроводжуються нейродегенеративними процесами [10]. Зокрема підвищується ризик розвитку хронічної травматичної енцефалопатії та хвороби Альцгеймера [11]. Прижиттєві методи діагностики виявилися здебільшого недостатньо чутливими для виявлення ранніх ознак нейродегенеративного захворювання. З урахуванням цього тваринні моделі є одним з небагатьох способів відтворити наслідки легкої ЧМТ і дослідити їх на клітинному рівні.

Наразі отримано чимало важливих даних щодо наслідків ЧМТ різної тяжкості [12–14], що дало змогу впровадити нові методи лікування таких наслідків, водночас експериментальні дослідження залишаються необхідними у зв'язку з неоднозначністю перебігу легких форм травми. Особливої уваги потребують моделі для вивчення нейродегенеративних захворювань внаслідок механічного пошкодження головного мозку, оскільки вже наявні методики не передбачають повного відтворення каскаду ЧМТ у людей без втручання в генотип лабораторних тварин [15, 16]. Маловивченою залишається також рання динаміка розвитку наслідків легкої ЧМТ, зокрема повторної. Отже, дослідження морфологічних і фізіологічних особливостей повторюваної легкої ЧМТ, зокрема її нейродегенеративних наслідків, є актуальними. У нашому дослідженні головним чином увагу було приділено наслідкам повторюваної легкої

ЧМТ у короткі проміжки часу після безпосереднього механічного пошкодження голови.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана відповідно загальному плану науково-дослідних робіт відділу сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014-2018; номер державної реєстрації – 0113U007273).

Мета дослідження

Мета дослідження – визначити морфофункціональні характеристики головного мозку при експериментальній повторюваній легкій черепно-мозковій травмі мишей, а також вплив корвітину на стан головного мозку і поведінку після такого пошкодження.

Задачі дослідження.

Для досягнення мети було поставлено такі задачі:

1. оцінити поведінкові характеристики мишей після відтворення травми у тестах «Відкрите поле» і «Т-лабіринт»
2. оцінити ступінь набряку головного мозку мишей після моделювання травми

3. оцінити структурні зміни нейронів СА1-зони гіпокампа після відтворення травми
4. оцінити структурні та кількісні зміни клітин астро- та мікроглії у СА1-зони гіпокампа після відтворення травми
5. оцінити поведінкові характеристики травмованих мишей після введення корвітину у тестах «Відкрите поле» і «Т-лабіринт»
6. оцінити вплив корвітину на стан структурних та кількісних характеристик клітин астро- та мікроглії у СА1-зони гіпокампа

Об'єкт досліджень: головний мозок та поведінкові характеристики мишей після повторюваної легкої ЧМТ та введення корвітину.

Предмет досліджень: зміни поведінкової активності та структури тканини головного мозку мишей після моделювання повторюваної легкої ЧМТ та наступного введення корвітину.

Наукова новизна одержаних результатів

У нашому дослідженні було деталізовано відомості щодо морфофункціональних наслідків повторюваної легкої ЧМТ у головному мозку мишей та вперше отримано дані про ефективність їх фармакологічної корекції, зокрема водорозчинною формою кверцетину корвітином.

У роботі вперше було досліджено вплив корвітину на поведінкові прояви та структуру головного мозку мишей у моделі такого різновиду травми голови, як повторювана легка ЧМТ. Підтверджено вплив повторюваної легкої ЧМТ на поведінкові характеристики у «Відкритому

полі» і Т-лабіринті. Вперше показано появу електронощільних «темних нейронів» у СА1-зоні гіпокампа травмованих тварин. Показано наслідки повторюваної легкої ЧМТ навіть у короткі терміни після механічного пошкодження, які проявлялись у астро- та мікрогліозі. Вперше показано зниження інтенсивності астро- та мікрогліозу після серії ін'єкцій корвітину. Отже, корвітин виявив нейропротекторну дію в моделі повторюваної легкої ЧМТ і може розглядатися як потенційний засіб лікування або профілактики таких ушкоджень.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів

Результати дослідження можуть бути використані для поглиблення знань про механізми залежності морфофункціонального стану структур головного мозку від механічного пошкодження, оскільки експериментально підтверджують необхідність лікувальних або профілактичних заходів навіть при легкій ЧМТ. Крім цього, отримані дані можуть бути використані для теоретичних курсів з біологічних та медичних спеціальностей.

Отримані дані свідчать про здатність корвітину пригнічувати запальні процеси, що проявлялися у астро- та мікрогліозі. Таким чином, корвітин може розглядатись як потенційний засіб профілактики і лікування щодо наслідків легкої ЧМТ.

Особистий внесок здобувача

Здобувачем особисто здійснено пошук інформації та проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження, виконано

експериментальні дослідження, обробку та теоретичне обґрунтування результатів, підготовку матеріалів до публікації. Підготовку електронномікроскопічних зразків гіпокампа здійснено К. Г. Сможаник (провідний інженер), відділ цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи були представлені на міжнародному науковому симпозіумі молодих науковців «Young Researchers in BioSciences» (Клуж-Напока, Румунія, 2014), міжнародній конференції молодих науковців «Conference for Young Scientists» (Київ, Україна, 2015), XII Національній школі молодих вчених-фармакологів ім. Академіка НАМН України О. В. Стефанова (Київ, Україна 2016), VII Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, Україна, 2017). "Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині, (Київ, Україна 2017); 2nd neurology and rehabilitation international symposium “Neuroregeneration” to commemorate prof. Oleksandr Chernyakhivsky, (Київ, Україна, 2018).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових праць, з них 4 статті у наукових фахових виданнях України, 1 стаття у міжнародному фаховому виданні, 7 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій і з'їздів.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається із вступу, чотирьох розділів, висновків, переліку використаної літератури та списку опублікованих за темою дисертації праць. Обсяг дисертації становить 133 с. Дисертаційна робота ілюстрована 23 рисунками. Список використаної літератури налічує 195 джерел.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Згідно з визначенням Центру з контролю та профілактики захворювань [1], черепно-мозкова травма зумовлена зіткненням, ударом, струсом або проникним пораненням голови, які порушують нормальне функціонування головного мозку. Легка ЧМТ є закритою травмою голови внаслідок сил прискорення або гальмування, які призводять до одного або декількох з наступних симптомів [2]: 1) тимчасової втрати орієнтації; 2) втрати свідомості на 0–30 хв; 3) нападу (*seizure*) одразу після травми голови; 4) серед немовлят та малих дітей – збудливості, летаргії або блювоти; 5) серед старших дітей та дорослих – головного болю, запаморочення, збудливості, втоми або зниження концентрації. У більшості наукових джерел поняття легкої ЧМТ є взаємозамінним із поняттям струсу головного мозку [17]. Проте між їх визначеннями існує різниця, яка полягає у наступному. Легка ЧМТ визначається за шкалою Glasgow Coma Scale, тоді як струс є клінічним синдромом, що може перекриватися з легкою, помірною та тяжкою ЧМТ. Головними причинами легкої ЧМТ є падіння, дорожньо-транспортні пригоди, насилля, заняття контактними видами спорту (футбол, бокс, хокей тощо) та участь у воєнних діях [3].

У деяких випадках гострі симптоми легкої ЧМТ не включають втрату свідомості, а структурні порушення залишаються непоміченими (за наявності функціональних) [18], проте вона може призвести до стійких когнітивних, поведінкових і психічних ускладнень [19, 20]. Крім цього, повторюваність випадків легкої ЧМТ підвищує ризик відстроченого розвитку таких нейродегенеративних патологій, як хвороби Альцгеймера та Паркінсона, хронічна травматична енцефалопатія та ін. [21-23].

Стандартні методи діагностики, магнітно-резонансна томографія, комп'ютерна томографія та електроенцефалографія, малочутливі до структурних порушень за легкої ЧМТ і можуть показувати результати в межах норми [11, 19]. Однак Енн МакКі, відомий спеціаліст у галузі спортивних травм, під час посмертного аналізу знайшла в головному мозку гравців у бокс та футбол (45–80 років) накопичення гіперфосфорильованого τ -білка [24]. У фізіологічних умовах він є стабілізатором нейронних мікротрубочок, але за патології піддається гіперфосфорилуванню, що призводить до утворення токсичних для нейронів нейрофібрилярних клубків [25]. Цей процес найчастіше зустрічається при хворобі Альцгеймера, проте за наявності в історії хвороби повторних струсів головного мозку особливості розподілу гіперфосфорильованого τ -білка частіше говорять про хронічну травматичну енцефалопатію [26, 27]. Припускають, що вірогідність розвитку останньої та тяжкість її перебігу залежать від виду спорту, положення, тривалості піддавання, віку у момент першої чи повторної травми, генетичної схильності тощо [28]. За даними дослідження з пізніх когнітивних порушень внаслідок низки струсів головного мозку, серед колишніх гравців в американський футбол 61 % піддавались одноразовому струсу, тоді як 24 % зазнавали три або більше випадки [29]. Іншу велику групу ризику щодо легкої ЧМТ складають військовослужбовці.

Часто людина не підозрює про те, що зазнала струсу головного мозку [30]. У зв'язку з цим були створені освітні програми, які забезпечують слухачів інформацією про ознаки легкої ЧМТ та заходи, необхідні для попередження або знешкодження її наслідків [31]. Особливо ці програми стосуються спортсменів та батьків дітей, які займаються спортом. Для спортсменів також був розроблений спеціальний мобільний

додаток-опитувач, що дає змогу визначити необхідність звернення до лікаря після можливого струсу [32].

Однак лікування за легкої ЧМТ досі ґрунтується на її зовнішніх виявах [33], а патофізіологія залишається маловивченою. Знання наслідків струсу на тканинному рівні є необхідною умовою пошуку ефективних і надійних засобів лікування і попередження нейродегенеративних наслідків.

1.1. Біомеханіка легкої черепно-мозкової травми

При струсі головного мозку, або легкій ЧМТ, голова може зазнати багатьох різних рухів, що робить обставини кожного випадку майже унікальними. Виділяють дві головні сили, пов'язані з ЧМТ – контактну та інерційну [34]. Вони діють, коли голова зазнає удару об поверхню. Якщо відбувається раптовий рух голови без удару, діє лише інерційна сила. Першочерговою причиною легкої ЧМТ є саме ця сила, яка стосується прискорення. За рахунок рухів голови та шиї при типовій травмі відбувається лінійне та кутове прискорення. Перше є входом ззовні, внутрішньою реакцією на який є підвищення тиску у головному мозку, з чим корелює розвиток неврологічного розладу. Головний механізм пошкодження при струсі полягає у тиску та розтягненні внаслідок кутового прискорення. Наявність останнього підвищує ризик втрати свідомості після травми. Якщо лінійне прискорення позитивно корелює з підвищенням тиску в головному мозку, то кутова складова визначає обсяг пошкодженої тканини.

За даними експериментальних досліджень, механічний вплив при легкій ЧМТ призводить до порушення нейронних та гліальних мереж, а також біохімічної сигналізації [35, 36]. Зокрема, поширеним наслідком

механічної травми голови є дифузне аксонне пошкодження: викликане прискоренням та гальмуванням головного мозку всередині черепа, воно полягає у розтягненні аксонів і наступному вивільненні хімічних речовин, які запускають запальні процеси та інші складові вторинного пошкодження. Таким чином, механічне, або первинне пошкодження головного мозку призводить до запуску каскаду уражень на рівні тканин, клітин, біохімічних і молекулярних механізмів.

1.2. Події каскаду черепно-мозкової травми

При ЧМТ виділяють первинне та вторинне пошкодження головного мозку [37]. Перше характеризується неспецифічною втратою клітин внаслідок локальної, дифузної або змішаної травми, зумовленої безпосередньою дією механічної сили. Його супроводжують вторинні процеси (вторинне пошкодження, рис. 1.1) [38], які призводять до



Рис. 1.1. Складові вторинного пошкодження при ЧМТ. Ілюстрацію адаптовано з Khatri et al, 2018 [38] (перекладено автором).

тривалої втрати клітин та системних порушень [13].

Вчені відносять до вторинних процесів такі [39-41]: а) за рахунок внутрішньочерепних факторів – відстрочені гематоми, порушення гемостаза ліквороциркуляції внаслідок субарахноїдального або внутрішньошлуночкового крововиливу, збільшення об'єму мозку в результаті набряку, гіперемії або венозного повнокрів'я, внутрішньочерепну інфекцію; б) за рахунок зовнішньочерепних факторів – артеріальну гіпотензію, гіпоксемію, гіперкапнію, анемію тощо.

На молекулярному рівні розвиток ЧМТ відбувається наступним чином [42]. За первинним пошкодженням, яке є безпосереднім результатом прикладання зовнішньої сили та запускає механічну деформацію тканин, слідує вторинне, що включає в себе дифузну деполаризацію нейронів і вивільнення збуджуючих нейромедіаторів (глутамату та аспартату). Зв'язуючись з глутаматними рецепторами, вони викликають потужний приплив кальцію. Активовані кальцієм, кальційзалежні фосфоліпази, протеази та ендонуклеази руйнують жири, білки та нуклеїнові кислоти. Депонування кальцію в мітохондріях спричинює порушення кальцієвого обміну, дефіцит енергії, формування вільних радикалів та ініціацію апоптозу. Каскади цих процесів, супроводжуючись пошкодженням і загибеллю клітин, призводять до функціональних порушень мозку.

Патофізіологічні процеси при ЧМТ включають зміни як у сірій, так і в білій речовині головного мозку. Якщо втрата нейронів відбувається локально, то загибель олігодендроцитів може бути ознакою дифузної травми [43]. Астроцити, інша складова нейроглії, активуючись у відповідь на запальні процеси, виробляють мікрофіламенти та нейротрофіни, щоб синтезувати рубцеву тканину на місці пошкодження [44]. Запускає запалення мікроглія. Вона, активуючись у відповідь на сигнали від пошкоджених клітин, набуває амебоїдної форми і мігрує у напрямку

уражених ділянок [45]. Ці активовані клітини виробляють як прозапальні медіатори, так і антизапальні цитокіни, відіграючи подвійну роль у розвитку ЧМТ.

За даними експериментальних досліджень, при повторюваній легкій ЧМТ спостерігається хронічний астро- та мікрогліоз [46]. Процеси гліозу відображались у зростанні кількості астроцитів та клітин мікроглії і були зафіксовані в таких ділянках гіпокампа, як бахромка (*fimbria*) та CA1-зона, через 3 міс після нанесення останньої травми (7 травм/9 днів). Активована форма астроцитів визначається посиленою експресією білка GFAP (від англ. *glial fibrillary acidic protein*), який у клінічних дослідженнях розглядається як потенційний маркер легкої ЧМТ у крові та спинномозковій речовині [47]. Іншою сполукою, експресія якої залежить від інтенсивності гліозу, є кальцій-зв'язуючий білок S100- β . Реактивний гліоз також характеризується гіпертрофією астроцитів. Мігруючи до місця пошкодження та утворюючи гліальний рубець, останні, з одного боку, обмежують ділянку подальшого ураження нейронів, а з іншого, перешкоджають відновленню їх відростків, у чому відображається їх негативна роль [48]. Біохімічна функція астроцитів при пошкодженні нервової тканини полягає у виділенні таких факторів росту, як NGF (від англ. *nerve growth factor*), BDNF (від англ. *brain-derived neurotrophic factor*), еритропоетин тощо [49]. Ці сполуки мають нейропротективне значення для нейронів.

Як і астроцити, клітини мікроглії беруть участь у BDNF-сигналізації та виділенні інших нейропротективних факторів [50]. Крім цього, при ЧМТ серед її функцій усунення залишків мертвих клітин (через фагоцитоз) і вироблення протизапальних цитокінів і хемокінів (CD206, CD163, FC γ R, аргіназа 1, Ym1 і TGF β) [51]. Однак для мікроглії також характерний запуск запальних процесів, що призводять до дисфункції нейронів і їх загибелі. Запальними речовинами мікроглії є інтерлейкін-1 β ,

фактор некрозу пухлини- α , інтерлейкін-6, індукбельна синтаза оксиду азоту та інтерлейкін-12p40. Неоднозначність мікрогліальної активності, зокрема, пояснюється наявністю двох молекулярних фенотипів у цих клітин – M1 та M2. Останній сприяє таким регенеративним процесам після ЧМТ, як нейрогенез, ангиогенез, олігодендрогенез та ремієлінізація, а фенотип M1 зумовлює подальше ураження тканини та нейродегенерацію.

1.3. Класифікація черепно-мозкових травм

ЧМТ, головним чином, класифікують як легкі, помірні та тяжкі [37]. Найпоширенішою міжнародною шкалою, за якою оцінюють тяжкість травми, є Glasgow Coma Scale (GCS) [52]. Її принцип полягає у визначенні стану свідомості за такими параметрами, як реакція очей, здатність до мовлення та рівень моторної функції. Можливі бали варіюють від мінімального 3 (глибока втрата свідомості, кома) до максимального 15 (повна притомність). Таким чином, тяжка ЧМТ відповідає кількості балів 8 або менше, помірна – 9-12, легка – 13-15.

Проте GCS не відображає гетерогенність ЧМТ в межах кожного з рівнів тяжкості, наприклад, патоанатомічні особливості кожного окремого випадку [53].

Внаслідок механічної травми головний мозок може зазнати фокального або дифузного пошкодження [54]. Фокальне внутрішньочерепне пошкодження проявляється субдуральною або епідуральною гематомою або паренхімною контузією, тоді як дифузне характеризується едемою та аксонним пошкодженням.

1.4. Нейродегенеративні патології як наслідок легкої черепно-мозкової травми

Посмертні дослідження головного мозку спортсменів та військовослужбовців, які належать до головних груп ризику легкої ЧМТ, показали підвищену частоту ознак нейродегенеративних захворювань за наявності в біографії одного або кількох випадків струсу [8, 21, 23]. Найчастіше результати свідчили про зв'язок повторної легкої ЧМТ із розвитком хронічної травматичної енцефалопатії. Це поняття введено на початку 2000-х років американським судовим патологом, який, досліджуючи головний мозок колишнього гравця в американський футбол, зафіксував підвищений вміст гіперфосфорильованого τ -білка за відсутності макроскопічних змін нервової тканини [55]. При цьому у хворого до загибелі спостерігали емоційні, поведінкові та когнітивні розлади. З 1920-х років застосовували більш вузьке поняття *dementia pugilistica*, яке полягало у розвитку деменції внаслідок повторної травми голови під час боксерських поєдинків [56]. Зараз *dementia pugilistica* вважається підтипом хронічної травматичної енцефалопатії. Посмертний гістологічний та імуногістохімічний аналіз головного мозку з ознаками цього захворювання являють собою єдину можливість поставити остаточний діагноз. Проте великі надії покладаються на прижиттєву візуалізацію накопичень τ -білка та β -амілоїда за допомогою позитронно-емісійної томографії [57, 58], а також дифузійно-тензорної томографії (*diffuse tensor imaging*). Останній метод дає змогу визначити зміни розподілу води у білій речовині головного мозку внаслідок її пошкодження і виявився достатньо чутливим для діагностики легкої ЧМТ [59]. Крім хронічної травматичної енцефалопатії, результати аналізу посмертних зразків головного мозку свідчать про підвищений ризик хвороби Альцгеймера та хронічної травматичної енцефалопатії. За обох

захворювань спостерігається накопичення гіперфосфорильованого τ -білка, проте патології відрізняються особливостями його розподілу.

Хвороба Альцгеймера – це нейродегенеративне захворювання, що є різновидом деменції і характеризується стійким незворотним порушенням когнітивних функцій внаслідок органічного ураження головного мозку [60]. Морфологічні зміни при цьому полягають в утворенні β -амілоїдних бляшок та нейрофібрилярних клубків, спричинених гіперфосфорилуванням τ -білка. Мета-аналіз контрольних випадків та таких з ЧМТ показав, що ризик розвитку захворювання зростає на 50 % у людей, які зазнали помірної чи тяжкої поодинокі травми головного мозку [8], чого не було виявлено за легкої ЧМТ. Дані щодо розвитку хвороби Альцгеймера після легкої ЧМТ бувають неоднозначними через потенційну належність нейродегенеративних змін головного мозку як до ХА, так і до хронічної травматичної енцефалопатії [21]. Припускають, що зв'язок між механічною травмою головного мозку та хворобою Альцгеймера починається з розтягнення аксонів [61, 62], яке призводить до порушення транспорту протеїнів та їх накопичення в аксонних розширеннях (axonal bulbs). Далі, внаслідок розщеплення попередника, утворюється β -амілоїд, який накопичується у внутрішньоаксонному просторі. Наступні дегенерація та лізис аксона зумовлюють вихід білка у паренхімний простір та утворення ним бляшок, наявність яких є однією з ключових морфологічних ознак хвороби Альцгеймера.

Епідеміологічні дані свідчать про підвищену частоту захворюваності на хворобу Альцгеймера у людей, які протягом життя неодноразово зазнавали струсу головного мозку [63], проте інформації про механізм розвитку патології через механічну травму недостатньо для повного уявлення [64].

На тканинному та клітинному рівнях динаміка розвитку нейродегенеративних процесів, зумовлених поодинокію чи повторною

легкою ЧМТ, залишається маловивченою, що робить необхідним використання тваринних моделей.

1.5. Легка черепно-мозкова травма як фактор ризику у розвитку епілепсії

Протягом багатьох років також відомо, що ЧМТ, від легкої до тяжкої форми, є фактором ризику у розвитку епілепсії (пост-травматична епілепсія) і залишається ним навіть через тривалий проміжок часу після отримання травми голови [65].

Епілептичний напад – це тимчасова поява ознак та/або симптомів внаслідок патологічної надмірної або синхронної нейронної активності головного мозку [66]. Епілепсія – розлад головного мозку, який характеризується тривалою схильністю до генерації епілептичних нападів і нейробіологічними, когнітивними, психологічними і соціальними наслідками цього захворювання.

Пост-травматичну епілепсію відносять до випадків епілепсії, яка розвивається внаслідок ЧМТ.

Sick et al [67] моделювали у щурів ЧМТ різної тяжкості і знайшли, що кожна з них супроводжується появою епілептиформної активності щонайменше через рік після нанесення травми. У кортикограмі параметри спайків/хвиль, характерних для такої активності, не корелювали із тяжкістю ЧМТ.

Shandra et al (2019) [68] досліджували взаємозв'язок між характером астрогліозу залежно від тяжкості ЧМТ та посттравматичною епілепсією. Автори спиралися на попередні дані, які свідчили про утворення гліальних шрамів внаслідок фокальної ЧМТ. Їх роль полягає у захисті нервової тканини від подальшого вторинного пошкодження. Таким

чином, безпосередня ділянка фокальної травми відмежується від здорової тканини. Проте саме з ними пов'язують розвиток епілепсії у гіпокампі та корі. Оскільки більшість випадків механічного пошкодження головного мозку все ж складають дифузні ЧМТ (внаслідок впливу сил прискорення-гальмування та розтягування тканини), вчені вирішили визначити особливості астрогліозу саме за такого різновиду. Після відтворення моделі закритої дифузної травми, яку використовували в експерименті, у мишей виявили нетипові астроцити. Ці клітини не утворювали шрами, як при фокальному механічному пошкодженні, проте саме за їх наявності у мишей траплялись епілептичні напади.

Отже, різні форми ЧМТ, включаючи легку форму, є одним із факторів ризику щодо розвитку пост-травматичної епілепсії.

1.6. Експериментальні моделі черепно-мозкової травми

Головними об'єктами при моделюванні ЧМТ є лабораторні миші та щури у зв'язку з невеликими розмірами, вартістю та тривалістю життя. Також зустрічаються дослідження з використанням кішок і свиней. На кішках була випробовувана рідинно-перкусійна модель ЧМТ [69, 70], а новонароджені карликові свині використовувались для складної моделі, що включала зміщення головного мозку внаслідок кутового прискорення [71].

У сучасних дослідженнях широко застосовуються чотири способи моделювання ЧМТ [42] (рис. 1.2): 1) рідинно-перкусійне пошкодження (fluid percussion injury), 2) контрольоване кіркове пошкодження (controlled cortical impact injury), 3) пошкодження в результаті вільного падіння вантажу (weight-drop impact acceleration injury), 4) пошкодження, викликане вибуховою хвилею (blast injury). Зміна параметрів установок

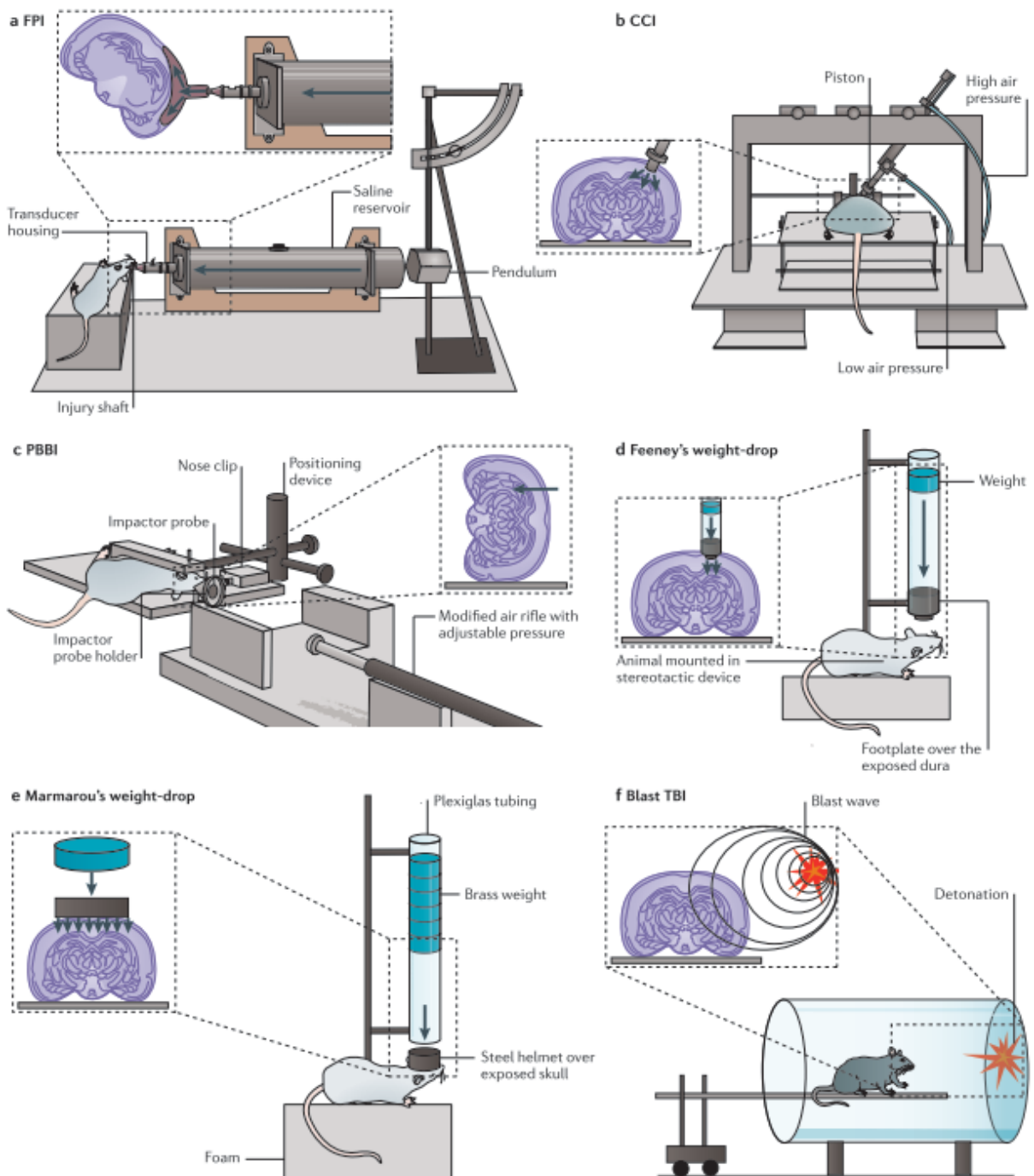


Рис. 1.2. Приклади експериментальних установок для моделювання ЧМТ. Ілюстрацію запозичено з огляду Xiong et al, 2013 [42].

дає змогу використовувати кожну з цих моделей для відтворення як легких, так і тяжких форм ЧМТ. Більш рідкісним є непрямий спосіб нанесення травми, наприклад, введення токсину, який запускає деякі процеси, характерні для ЧМТ [72].

У зв'язку з принципом нанесення ЧМТ її моделі відрізняються за двома основними ознаками: розрізається череп для оголення твердої оболонки чи залишається інтактним, призводить пошкодження до локальної травми чи дифузної. У моделях рідинно-перкусійного та контрольованого кіркового пошкодження необхідна трепанація, тоді як моделі вільного падіння вантажу (за виключенням моделі Фіні) та пошкодження, викликане вибуховою хвилею, такого втручання не потребують. Локальність або дифузність травми визначаються кожним окремим різновидом моделі.

Рідинно-перкусійне пошкодження головного мозку є найбільш поширеною та вивченою моделлю ЧМТ. Її принцип полягає у нанесенні травми через швидку подачу потоку рідини до оголеної ділянки інтактної твердої оболонки головного мозку [69, 70, 73]. Потік рідини спрямовується трубкою, що поєднує апарат і ділянку пошкодження. Ступінь пошкодження залежить від тиску, який потік рідини справляє на головний мозок [74]. Тиск, у свою чергу, регулюється через висоту, з якої маятник вдаряє по резервуару з рідиною. Існує два різновиди рідинно-перкусійного пошкодження – центральний (вертексний) і латеральний. Перший передбачає кранієктомію в ділянці на серединній лінії між лямбдою та брегмою, тоді як при латеральному пошкодженні кранієктомія здійснюється у парієтальній ділянці. Обидві моделі, за помірної тяжкості, викликають тимчасову гіпертензію, підвищення внутрішньочерепного тиску, порушення мозкового кровотоку, зростання проникності гемато-енцефалічного бар'єру, порушення іонного гомеостазу та загибель нейронів. Центральне рідинно-перкусійне пошкодження призводить до дифузної травми, а латеральне – як до дифузної, так і локальної [75].

Модель контрольованого кіркового пошкодження також часто використовується у дослідженнях наслідків ЧМТ, оскільки має низку регульованих параметрів. У її основі лежить прикладення механічної

енергії до інтактної ділянки твердої оболонки головного мозку за допомогою пневматичної або електромагнітної установки після латеральної краніектомії [42, 76]. Серед параметрів, які дають змогу контролювати характеристики травми, тривалість, швидкість і глибина пошкодження. У зв'язку з цим модель контрольованого кіркового пошкодження підходить для вивчення біомеханічних характеристик ЧМТ. Установка цієї моделі дозволяє відтворювати весь діапазон тяжкості травми від легкої до важкої, однак переважно вона використовується для моделювання помірної травми. У моделі контрольованого кіркового пошкодження спостерігають ураження гемато-енцефалічного бар'єру, субдуральну і інтрапаренхімальну гематоми, едему, запалення та порушення мозкового кровотоку.

У моделі вільного падіння череп тварини піддається вільному падінню спрямованого металевго вантажу [42]. Тяжкість травми при використанні цієї моделі визначається масою вантажу, що регулюється через кількість окремих циліндрів, і висотою, з якої він спускається. Здебільшого цей різновид експериментального пошкодження наноситься для відтворення закритої дифузної ЧМТ. Виключенням є модель Фіні [77], яка передбачає латеральну краніектомію та наступний спуск вантажу на відкриту ділянку твердої оболонки головного мозку.

Marraoui та співавт. розробили найбільш поширену модель падіння вільного вантажу [78]. Згідно з нею, наркотизованій експериментальній тварині (щур) оголюють череп за серединною лінією та приклеюють до його центральної частини металевий диск, щоб уникнути перелому кісток. Її головними перевагами є простота, можливість градування тяжкості травми від легкої до важкої, а також відсутність значних ушкоджень стовбура мозку при нанесенні травми. Морфологічно пошкодження призводило до ступінчатого ураження нейронів, аксонів і мікроциркуляторного русла. Також у головному мозку, переважно в корі

та стовбурі, спостерігали едему у вигляді перикапілярного астроцитарного набухання [79].

Окремим різновидом ЧМТ є пошкодження головного мозку, викликане вибуховою хвилею (blast TBI). Такий вид механічної травми зустрічається здебільшого під час вибухів у військових умовах. Складність цієї травми полягає в тому, що вона включає системні, локальні і мозкові відповіді, які взаємодіють і часто виникають паралельно [80]. З-за відсутності чітких критеріїв для її моделей способи експериментального відтворення широко варіюють, включаючи описані вище рідинно-перкусійне та контрольоване кіркове пошкодження. Моделі, в яких пошкодження викликане безпосередньо вибуховою хвилею, поділяються на дві групи: в першій у зафіксованої експериментальної тварини відтворюється травма тільки голови [81, 82], а у другій тварина не знерухомлюється, і пошкодженню від вибухової хвилі піддається весь організм [83, 84].

Однак легку ЧМТ здебільшого відтворюють за допомогою моделей рідинно-перкусійного пошкодження та пошкодження внаслідок вільного падіння вантажу. Наприклад, Kane та співавт. [85] розробили модифікацію механічного пошкодження за Marmarou [78], знизивши смертність лабораторних тварин та передбачивши кутове прискорення головного мозку після отримання травми, що наблизило модель до реальних умов.

З епідеміологічних та клінічних досліджень відомо, що у людей повторювана легка ЧМТ підвищує ризик розвитку нейродегенеративних патологій, проте ряд суттєвих відмінностей між нейрохімією людського головного мозку та, наприклад, мозку миші не дозволяє визначити такі наслідки у лабораторних тварин дикого типу. У нервовій системі мишей та щурів, на відміну від людей, не відбувається аналогічних процесів амілоїдозу та накопичення гіперфосфорильованого τ -білка. Вчені знайшли

вихід у модифікації тваринного генотипу, досягши відтворення кожного з цих процесів окремо.

Для з'ясування, чи є повторювана легка ЧМТ фактором ризику щодо розвитку хвороби Альцгеймера, було створено модель, яка передбачала експресію мутантного людського попередника β -амілоїда у трансгенних мишей (Tg2576) [15]. Моделлю травми слугувало контрольоване кіркове пошкодження. За допомогою поведінкового тесту у водному лабіринті (Morris Water Maze) було показано пригнічення когнітивної функції у трансгенних мишей, а імуногістохімічний аналіз та ELISA виявили посилене накопичення β -амілоїда, що доводить вагомість повторюваної легкої ЧМТ як фактору ризику щодо розвитку хвороби Альцгеймера.

Іншою характеристикою хвороби Альцгеймера, відтворюваною в експериментальних умовах, є утворення нейрофібрилярних сплетень, зумовлене накопиченням гіперфосфорильованого τ -білка. Цього патологічного процесу досягали за допомогою трансгенних мишей, у яких було заблоковано вироблення власного τ -білка та запущено утворення людського (Tg30 τ -/-) [86]. Як у випадку із трансгенними мишами, які були здатні до вироблення β -амілоїда, у тварин з людським τ -білком спостерігали збільшення інтенсивності його утворення після повторюваної легкої ЧМТ [16].

Трансгенні тваринні моделі, розроблені для комплексного відтворення нейродегенеративних патологій та ЧМТ мають низку як переваг, так і недоліків. Такі лабораторні тварини, як миші та щури, не схильні до амілоїдозу та розвитку хвороби Альцгеймера. З цієї причини ускладнюється спостереження за природним перебігом патології в експериментальних умовах. Одне з вирішень проблеми полягає у використанні генетично модифікованих тварин, генотип яких передбачає розвиток захворювання. Проте навіть у цьому випадку експериментальна

патологія не відповідає повній характеристиці людської, оскільки визначається обмеженим набором ознак.

Наразі отримано чимало важливих даних з патофізіологічного каскаду ЧМТ різної тяжкості, що дало змогу впровадити нові методи лікування її наслідків, проте експериментальні дослідження залишаються необхідними у зв'язку з неоднозначністю перебігу легких форм травми. Особливої уваги потребують моделі для вивчення нейродегенеративних захворювань внаслідок механічного пошкодження головного мозку, оскільки вже наявні не передбачають повного відтворення патологічного каскаду у людей без втручання в генотип лабораторних тварин. Отже, цілісна картина морфологічних, молекулярних і фізіологічних особливостей повторюваної легкої ЧМТ, зокрема її нейродегенеративних наслідків, є справою майбутнього.

1.7. Біофлавоноїди як потенційний засіб корекції наслідків повторюваної легкої черепно-мозкової травми

У зв'язку з хронічною травматичною енцефалопатією увага до легкої ЧМТ зростає, однак засоби її лікування залишаються обмеженими [87]. Підвищення рівня глутамату при легкій ЧМТ активує катаболічні процеси, наслідком яких є вироблення пошкодженими мітохондріями реактивних сполук кисню, відповідно, окиснення мембранних ліпідів і посилення вторинного пошкодження (рис. 1.1) у головному мозку [88]. Реактивні сполуки кисню включають супероксиди, перекис водню, оксид азоту і пероксинітрит [44]. Астро- та мікроглія, зрештою, не справляються з усуненням вільних радикалів, і відбувається їх активація [88]. Запускаються процеси апоптозу. Природно, організм має ендogenous антиоксиданти, які знаходяться у балансі із вільними радикалами, але

коли останні виробляються у надмірній кількості, розвивається оксидативний стрес і власних антиоксидантів стає недостатньо [89]. Крім того, що мітохондрії виробляють реактивний кисень, порушується їх енергетична функція, тобто синтез АТФ.

Таким чином, засоби, які спрямовані на зниження оксидативного стресу, мають потенціал у боротьбі з наслідками легкої ЧМТ. Антиоксиданти здатні віддавати свої електрони відним радикалам, нейтралізуючи токсичні ефекти. Прикладами сполук, що знешкоджують вільні радикали, є глутатіон і едаравон. Проте короткий період напіврозпаду обмежує біодоступність цих препаратів [87].

Біофлавоноїди, сполуки рослинного походження, також виявляють антиоксидантні та протизапальні властивості [90–92]. Вони утворюють підклас поліфенолів, що містять два або більше ароматичних кілець, є поширеними у природі і продуктах харчування (фрукти, овочі, зерна, кора, коріння, стебла, квіти, чай і вино) [93].

Наприклад, було показано зниження запальних процесів, викликаних середньою ЧМТ, після фармакотерапії пікногенолом [94]. Цей препарат є запатентованою сумішшю флавоноїдів, видобутих з кори французької приморської сосни. Її головні складові – поліфеноли, зокрема моно- та олігомери кавової кислоти, ферулова кислота, катехін, епікатехін і таксифолін. Введення пікногенолу супроводжувалось послабленням оксидативного стресу як в корі головного мозку, так і в гіпокампі. Спостерігали його захисний вплив на ключові синаптичні білки, а також зниження запалення у тих самих ділянках.

Поширеним у медицині та експериментальних дослідженнях є біофлавоноїд кверцетин [95–97] (рис. 1.3).

In vitro механізм дії кверцетину головним чином полягає у гальмуванні вироблення запальних ферментів (циклооксигеназа та ліпоксигеназа) [98]. Крім цього, за його дії знижувались TNF- α (фактор

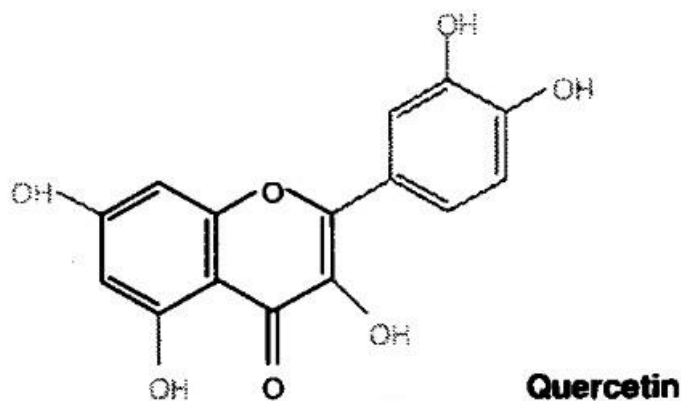


Рис. 1.3. Структурна формула кверцетину. Ілюстрацію запозичено з Middleton et al, 2000 [93].

некрозу пухлини), монооксид азоту та синтази моно оксид азоту. Помітний антиоксидантний вплив кверцетину спостерігали при багатьох патологіях нервової системи, зокрема ішемії головного мозку, спинно-мозкових травмах і ЧМТ [97, 99, 100].

Фінські вчені [101], спираючись на дані про зростання рівня S-100-β (білка, що експресується переважно астроцитами, а також олігодендроцитами) у сироватці при травмі центральної нервової системи (ЦНС), використали його як маркер ефекту після введення кверцетину у моделі спинномозкової травми у щурів. За результатами їх дослідження, введення препарату після травми зумовило підвищення концентрації білка, що свідчить про терапевтичний потенціал кверцетину. Крім цього, у щурів спостерігали відновлення моторної функції.

На наступному етапі автори вивчали міру, у якій відновлювалась моторна функція, залежно від схеми введення кверцетину. Оскільки раніше було показано, що рівень S-100β у сироватці крові відповідає тяжкості травм ЦНС, було висловлено припущення, що S-100β у тканинах ЦНС бере участь у нейропротективних і нейрорегенеративних процесах. Для вивчення залежності ефекту кверцетину від схеми його введення, дослідники здійснювали компресійне ушкодження середнього грудного відділу спинного мозку у дорослих щурів Wistar. Зразки сироватки та

тканин були взяті у тварин, яким вводили кверцетин (25 μ моль/кг) або фізіологічний розчин через 6, 12 та 24 години після травми. Рівень S-100 β вимірювали за допомогою люмінометричного аналізу в ушкодженій тканині та в сироватці крові тварин. Підвищення рівня S-100 β у сироватці крові, що спостерігається у тварин, яким після травми спинного мозку вводили фізіологічний розчин, було пригнічено у тварин, які отримували лікування кверцетином, у всі моменти часу, хоча відмінність від контролю із фізрозчином стала статистично достовірною лише через 24 години після травми. Порівняно з рівнями S-100 β у тканинах здорових тварин, значення показників в фізіологічному розчині були помітно знижені у всі три часові моменти, тоді як вони знижувались на 6 годин та збільшувались як у 12, так і в 24 години у тварин, які отримували кверцетин. У всіх трьох часових точках рівні тканинного S-100 β були значно вищими у тварин після введення кверцетину, ніж у таких із фізіологічним розчином. За висновками авторів, введення кверцетину призводить до модифікації рівня S-100 β в умовах експериментальної травми спинного мозку. Патерни коливань S-100 β в сироватці крові і тканинах свідчать про те, що посттравматичне введення кверцетину зменшує ступінь ураження ЦНС.

Крім цього, ті ж науковці [100] поставили задачу дослідити у тій же моделі спинномозкової травми і з такою ж дозою кверцетину, як на відновлення рухової функції у щурів впливає тривалість лікування.

Введення препарату почали через 1 год після травми. Тривалість лікування становила від однієї одноразової ін'єкції до 10 днів, частота ін'єкцій – 2-3 рази на день. Жодна з нелікованих контрольних тварин не відновила рухову функцію. Коли кверцетин вводили двічі на день протягом 3 або 10 днів, приблизно 50% набули її знову. Починали ходити дві з шести тварин, які отримували лише одну ін'єкцію, та одна із шести, які отримували три ін'єкції. Дивно, але жодна з тварин, які отримували

ін'єкції кверцетину тричі на день, не відновлювала здатність пересуватись. Отже, успіх лікування залежав від частоти введення та загальної дози.

Кверцетин у природному вигляді є водонерозчинним, що обмежує його ефективність. Науковці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця розробили водорозчинний комплекс кверцетину із повідоном під назвою корвітин, збільшивши біодоступність препарату. Корвітин застосували при ішемічному пошкодженні головного мозку у монгольських піщанок [102]. Ефект гострої ішемії шляхом перетискання сонних артерій визначали за станом нейронів у СА1-зоні гіпокампа, а також реакцією глії на 7-й день після ішемії-реперфузії. При застосуванні корвітину збільшувалась кількість нейронів, що вижили, крім цього, зменшувався реактивний астрогліоз. Отже, препарат проявив потенціал для фармакологічної корекції церебро-васкулярних порушень.

Оскільки в експериментальних умовах струс головного мозку, як і тяжчі форми ЧМТ та інші патології ЦНС, супроводжується оксидативним стресом і запальними процесами, а застосування кверцетину призвело до послаблення цих порушень, ми поставили мету визначити ефект його водорозчинної форми корвітину у моделі повторюваної легкої ЧМТ.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Всі етапи експерименту були проведені у відповідності до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Стаття 27; № 3447 – IV) та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

2.1. Тварини

До дослідження були залучені 154 самці нелінійної білої лабораторної миші віку 8-12 тижнів (маса – 24-40 г). Тварини утримувались у клітках із вільним доступом до їжі та води. Поділ на групи був наступним:

- 1) контроль – неанестезований, нетравмований (n=28);
- 2) контроль – анестезований нетравмований (n=28);
- 3) травмовані миші (n=57);
- 4) травмовані миші, яким вводили корвітин (n=41).

2.2. Модель повторюваної легкої черепно-мозкової травми

Модель плЧМТ (рис. 2.1), використана у нашому дослідженні [85], є модифікацією класичної моделі, яка передбачає вільне падіння вантажу на череп щура [78]. Тяжкість травми, згідно з обома моделями, залежить від маси вантажу та висоти, з якої він падає крізь направляючу трубку. У нашому експерименті вантаж масою 95 г спускався з висоти 1 м.

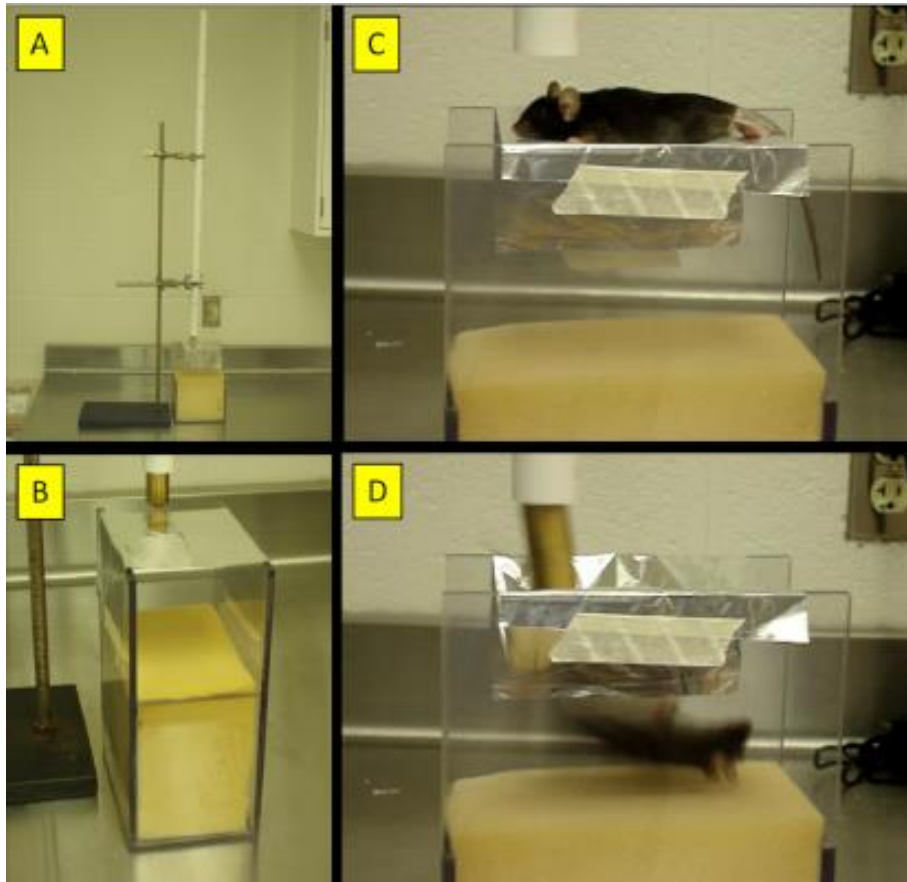


Рис. 2.1. Апарат для нанесення повторюваної травми головного мозку¹.

Складові апарату:

- коробка Н-форми² (розміри – 15 см x 9 см x 23 см, матеріал – органічне скло);
- вертикальна трубка для спрямування вантажу, що падає (довжина – 100 см, діаметр – 2 см, матеріал – ПВХ);
- штатив для фіксації трубки;
- циліндричний вантаж³ (діаметр – 1,9 см, матеріал – латунь);
- фрагмент фольги, на якому розташовується миша;
- губка, на яку падає миша після спуску вантажу на череп (розміри – 15 см x 9 см x 13 см).

¹ Зображення запозичено з Kane et al, 2012

² Стінки, ширина яких дорівнює 9 см, мають висоту 13 см.

Відстань, на яку падає вантаж, обмежується прикріпленою до нього ліскою. Таким чином, відхилення від місця удару складає 1 см.

Порівняно з класичною, ключовими для нової моделі є наступні характеристики. Тварина не фіксується в установці, а падає після удару на амортизуючу платформу крізь фрагмент фольги, попередньо приклеєний

до установки. За ствердженням авторів, такий метод нанесення травми наближає експеримент до реальних умов отримання струсу головного мозку у людини. Крім цього, тварина не отримує повторний удар при відскакуванні вантажу від платформи, оскільки його падіння обмежується довжиною ліски, прикріпленої до нього. Більше того, перед нанесенням удару не потребується розріз шкіри голови чи прикріплення шолому.

Механічне пошкодження наносили протягом п'яти днів (1 удар/день) після інгаляційної наркотизації за допомогою диетилового ефіру.

2.3. Введення корвітину

Корвітин (ЗАТ НВЦ "Борщагівський ХФЗ", Київ, Україна) що є комплексом біофлавоноїду кверцетину та полівінілпіролідону, вводили інтраперитонеально протягом 5 днів (день 1–2 – дві дози з інтервалом у 6 годин, день 3–5 – одна доза), починаючи від дня останньої травми. Доза корвітину складала 100 мг/кг (кверцетину – 10 мг/кг).

2.4. Оцінка неврологічного стану та поведінкові тести

Оцінювали неврологічний стан і поведінкові реакції мишей у моделі повторюваної легкої ЧМТ в контролі, після відтворення травми, а також наступної серії ін'єкцій корвітину. За тривалістю відновлення рефлексу випрямлення (righting reflex) визначали наявність впливу механічного пошкодження безпосередньо після удару, порівняно із анестезованим контролем. У «Відкритому полі» проводили тести на локомоторну активність та рівень тривожності, у Т-лабіринті – на рівень тривожності та здатність до просторової орієнтації.

2.4.1. Відновлення рефлексу випрямлення

Після кожного з п'яти ударів мишу одразу клали на спину на пласкій поверхні і фіксували час, необхідний для відновлення нормального положення тіла. Таким чином, оцінювалась тривалість неврологічного відновлення. Значення у мишей із травмою (анестезовані, травмовані; n=28) порівнювалися із такими у контролі (анестезовані, нетравмовані; n=20).

2.4.2. Поведінковий тест «Відкрите поле»

«Відкрите поле» здебільшого використовують для оцінки моторної функції через спостереження за спонтанною активністю експериментальних тварин [103]. Тварину розміщують у центрі «Відкритого поля» круглої або квадратної форми, розкресленого на квадрати або сектори. Далі фіксуються її дії, пов'язані з вмиванням, перетином ліній (їх певної кількості), загальною руховою активністю, схильністю до пересування у певних ділянках поля, а також/або дефекацією. Таким чином, здійснюється аналіз поведінки і рівня тривожності тварини.

Для визначення поведінкових реакцій внаслідок повторюваної легкої ЧМТ у «Відкритому полі» (рис. 2.2) тестували мишей:

- 1) без нанесення травми (n=8);
- 2) після серії ударів на день 5 (n=10), день 10 (n=9) та день 30 (n=8) від дня першої травми;
- 3) після серії ін'єкцій корвітину, які робили травмованим мишам – на день 5 (n=9), день 10 (n=9) та день 30 (n=9) від дня першої ін'єкції.



Рис. 2.2. Поведінковий тест «Відкрите поле». Протягом 30 хв для кожної миші фіксували: 1) кількість перетнутих ліній (локомоторна активність); 2) тривалість перебування у кутових зонах (тривалість відпочинку); 3) кількість актів грумінгу (рівень тривожності); 4) кількість актів дефекації (рівень тривожності). Перед початком тесту кожну мишу розміщували у центрі поля. Площа поля становила 1м x 1м.

У тварин визначали зміни у локомоторній активності, тривалості відпочинку у кутових зонах, активності грумінгу та рівні тривожності. Кожна миша перебувала на платформі протягом 30 хв. Площа платформи становила 1x1 м і складалась з 16 однакових квадратів. На початку тесту тварину розміщували у центрі платформи. Поведінкові реакції оцінювали наступним чином (кореляти поведінкових реакцій):

- 1) рівень локомоторної активності відповідав кількості ліній, які перетнула миша;

- 2) тривалість відпочинку відповідала кількості часу, який миша проводила у кутових зонах платформи;
- 3) активність грумінгу – кількості актів грумінгу (чухання, вмивання);
- 4) рівень тривожності – кількості актів дефекації.

2.4.3. Поведінковий тест «Т-лабіринт»

Поведінковий тест у Т-лабіринті (рис. 2.3) проводили для оцінки функції гіпокампу у контролі (n=10), після серії механічних ударів (n=19) та наступного введення корвітину (n=14). Гіпокамп пов'язується із процесами пам'яті, здатністю до просторової орієнтації, а також емоційною поведінкою, зокрема тривожністю.

Ми використовували різновид тесту, який називається «Spontaneous alternation» [104]. Його принцип виключає харчове підкріплення. Він дозволяє оцінити схильність експериментальної тварини до дослідження нового простору (чергування рукавів лабіринту), яка знижується за підвищеного рівня тривожності та погіршення здатності до запам'ятовування вже досліджених ділянок.

Послідовність кроків у Т-лабіринті є наступною.

1. Миші надається час для звикання до присутності експериментатора – його запаху, дотику, рухів, які він здійснюватиме щодо миші під час тесту, тощо. Дослідник виймає тварину з клітки, поміщаючи її у долонях, деякий час її тримає і повільно повертає в клітку. Повторюється декілька разів. Ця процедура дозволяє знизити рівень тривожності, пов'язаний безпосередньо із проходженням тесту, і таким чином зменшити час, протягом якого миша обиратиме рукав лабіринту. Далі



Рис. 2.3. Т-лабіринт для поведінкового тесту зі спонтанного чергування вибору (spontaneous alternation). Зображення запозичено з <https://sandiegoinstruments.com/product/t-maze/>.

2. тварину поміщають на стартовий майданчик (початок середнього рукава), обмежений клапаном на 30 с.
3. Через 30 с клапан виймають. Миша покидає майданчик і вільно рухається в межах Т-лабіринту, врешті опиняючись у лівому чи правому рукаві. Щойно вона опинилася в одному з них, дослідник «зачиняє» її у ньому на 30 с. Таким чином, миші надається час для запам'ятовування свого вибору. Дослідник робить запис про вибір лівого чи правого рукава.
4. Тварину повертають на стартовий майданчик, закривши його клапаном. Кроки 2 та 3 повторюються ще 9 разів (всього 10 разів).

5. Після безпосереднього тестування експериментатор підраховує кількість альтернативних виборів для кожної лабораторної тварини. Наприклад, вибір є альтернативним, якщо миша спочатку побувала у лівому рукаві, а після нього обрала правий. За 100 % беруться 9 виборів, серед них визначають відсоток альтернативних і здійснюють статистичне порівняння між різними вибірками мишей (контроль, травма – Д10, Д30, введення корвітину – Д10, Д30).

2.5. Визначення ознак набряку

Наявність набряку визначали за допомогою порівняння відсоткового вмісту води у контрольних мишей (n=8) і мишей через 4 години після останньої травми з п'яти (n=8). Ми використовували метод, описаний раніше [105, 106]. Мишей було декапітовано, а головний мозок одразу ж вилучено з черепа. Цілий свіжий головний мозок зважували на алюмінієвій фользі, висушували протягом 90 годин при 73°C у термостаті і знову зважували. Відсотковий вміст води у кожному мозку визначали за формулою:

$$(\text{мокра вага} - \text{суха вага}) / (\text{мокра вага}) \times 100.$$

2.6. Гістологічний, електронномікроскопічний та імуногістохімічний аналіз

Морфологічні зміни головного мозку після відтворення повторюваної легкої ЧМТ та наступного введення корвітину вивчали за допомогою гістологічного та імуногістохімічного забарвлення, а також

електронномікроскопічного методу. Електронну мікроскопію використовували для визначення стану нейронів на ультраструктурному рівні, включаючи наявність або відсутність ознак набряку. Гістологічні препарати, забарвлені метиленовим синім, аналізували щодо загальної структури СА1-зони гіпокампа та пірамідних нейронів. Імунофлуоресценцію (імуногістохімію із використанням флуоресцентно мічених вторинних антитіл) застосовували для кількісної та якісної оцінки нейронів і клітин глії (астроцитів і клітин мікроглії).

Всі морфологічні зміни на клітинному рівні аналізували у СА1-зоні гіпокампа, враховуючи її чутливість до нейродегенеративних процесів.

2.6.1. Транскардіальна перфузія мишей

Для гістологічного та імуногістохімічного аналізу зразків головного мозку проводили його фіксацію шляхом транскардіальної перфузії експериментальних тварин 0.1 М фосфатним буфером та 4% параформальдегідом (рис. 2.4). Послідовність проведення перфузії була наступною [107].

1. Приготування перфузійних розчинів – 0.1 М фосфатного буферу та 4% параформальдегіду.
2. Встановлення крапельної системи для подачі розчинів. Швидкість подачі розчинів регулювали через висоту, на якій знаходилась крапельна система.
3. Глибока інгаляційна наркотизація тварин диетиловим ефіром.
4. Хірургія тварин у ділянці грудної клітки для отримання доступу до серця.

(А) Під'єднання крапельної системи до лівого шлуночка серця

(Б) Вилучення головного мозку

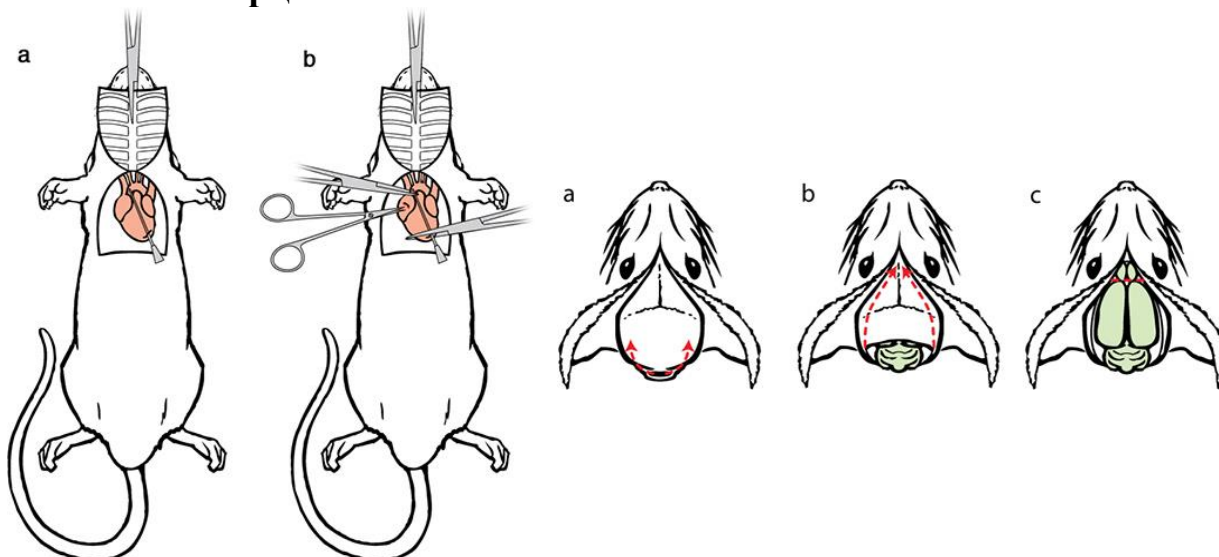


Рис. 2.4. Хірургія при транскардіальній перфузії експериментальних тварин. Ілюстрацію запозичено з Gage et al, 2012 [107].

5. Введення голки, під'єднаної до трубки крапельної системи, у лівий шлуночок серця. Надрізання «вушка» правого передсердя.
6. Перфузія 0.1 М фосфатним буфером великого кола кровообігу до повного освітлення печінки.
7. Зміна перфузійного розчину на 4% параформальдегід. Перфузія протягом кількох хвилин до затвердіння тканин.
8. Вилучення головного мозку з черепа.

2.6.2. Гістологічне забарвлення напівтонких зрізів

Для гістологічного забарвлення 1% розчином метиленового синього (0,25 г метиленового синього у 25 мл 1% розчину бури) використовували напівтонкі зрізи товщиною 2 μm .

Процедура забарвлення проводилась наступним чином:

1. 3-4 напівтонкі зрізи переносили дротовою петлею у краплю дистильованої води діаметром 1 см на предметному склі.
2. Предметне скло поміщали на спиртівку при температурі 70-90°C і залишали до повного висихання.
3. На зрізи наносили краплю фарбника, яку тримали до набуття зрізами золотавого кольору (10-12 с). Після цього фарбник швидко змивали дистильованою водою.
4. Після змивання фарбника скло знову нагрівали для повного висихання.

2.6.3. Трансмійна електронна мікроскопія

Контрольних (n=2) і експериментальних мишей (n=3) анестезували за допомогою пентобарбіталу натрію (100 мг/кг маси тіла; Sanofi) і додатково випаровуваннями диетилового ефіру. Тварин перфузували транскардіально розчином 4% параформальдегіду і 2% глутаровим альдегідом у 0,1 М фосфатному буфері. Головний мозок вилучали і залишали в тому ж фіксуючому розчині на ніч при температурі 4°C, після чого ретельно промивали холодним розчином фосфатного буфера.

Коронарні зрізи головного мозку товщиною 50 нм отримували за допомогою вібротому VT1000A (Leica, Wetzlar, Germany). Додаткову фіксацію зрізів проводили у 1% розчині чотириокису осмію у буфері. Для зневодження використовували етанол, а заключали в епоксидні смоли (агар 100 смола, Araldite CY 212, DDSA, DMP-30; Plano, Німеччина) при 56°C протягом 48 годин.

Ультратонкі зрізи товщиною 50 μm контрастували розчинами ураніл-ацетату і цитрату свинця. Виготовлені зразки вивчали за допомогою електронного мікроскопа JEOL 100-CX (JEOL, Токіо, Японія) при 80 кВ.

2.6.4. Імуногістохімічне забарвлення та обробка зображень

На день 5, 10 і 30 від дня першої травми, а також на день 5 і 30 від дня першої ін'єкції мишей піддавали глибокій наркотизації через випаровування диетилового ефіру, після чого проводили інтракардіальну перфузію 0,1 М фосфатним буфером і далі 4% розчином параформальдегіду.

Після перфузії головний мозок швидко вилучали, поміщали у той самий фіксуєчий розчин і залишали на ніч для додаткової фіксації при температурі 4°C.

Коронарні зрізи товщиною 50 μm робили за допомогою вібратору (VT1000A Leica, Wetzlar, Німеччина). Зрізи залишали на ніч для інкубації у первинних антитілах, розведених у розчині (0,1 М фосфатний буфер, 1% бичача сироватка, 0,3% Triton X).

Імуногістохімічне забарвлення нейронів і клітин глії здійснювали відповідно до раніше описаного методу [108]:

- 1) занурення зрізів головного мозку у блокуючий розчин (на 1 год на шейкері, кімнатна температура)
- 2) занурення зрізів у розчин з первинними антитілами (на ніч на шейкері, $t=4^{\circ}\text{C}$)
- 3) промивання зрізів у 0,1 М фосфатному буфері (3 x 15 хв на шейкері, кімнатна температура)
- 4) занурення у розчин з вторинними антитілами (на 1,5 год на шейкері, кімнатна температура)

- 5) промивання у 0,1 М фосфатному буфері (2 x 15 хв на шейкері, кімнатна температура) та бідистильованій воді (1 x 15 хв)
- 6) заключення розправлених зрізів у середовище ImmuMount на предметних скельцях

Для клітинно специфічного забарвлення використовували наступні антитіла:

- 1) ядра нейронів – поліклональні мишачі антитіла до нейронних ядер (NeuN, 1:500, Millipore, Німеччина);
- 2) астроцити – поліклональні кролячі антитіла до гліального фібрилярного кислого білка (GFAP, 1:1500; Dako, Глостроп, Данія);
- 3) клітини мікроглії – поліклональні кролячі антитіла до Iba-1 (1:1000; Wako, Осака, Японія).

На наступний день зрізи інкубувались у вторинних антитілах, розведених у розчині (0,1 М фосфатний буфер, 0,5% бичача сироватка, 0,3% Triton X):

- 1) Alexa Fluor 488 (1:1000, Molecular Probes Inc., США)
- 2) Alexa Fluor 594 (1:1000, Molecular Probes Inc., США)

Забарвлені зрізи поміщали у спеціальне середовище для флуоресцентних препаратів (Thermo Scientific, Waltham, MA) на предметних скельцях.

Конфокальні зображення нейронів і клітин глії отримували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа (FV1000-VX61WI, Olympus, Токіо, Японія).

Для підрахунку клітин використовували програму “Image J”. Кількість клітин визначали у ділянці CA1-зони гіпокампа площею 0,09 мм² (300x300 μм) (рис. 2.5).

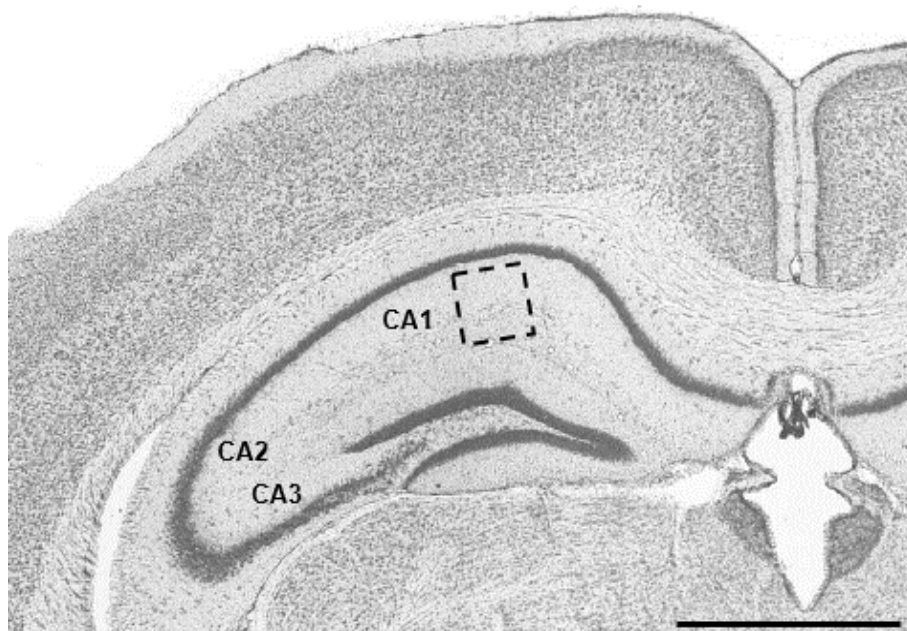


Рис 2.5. Ділянка підрахунків у CA1-зоні гіпокампа. CA1, CA2, CA3 – ділянки гіпокампа. Пунктирний квадрат позначає місце та розмір ділянки підрахунків. Шкала = 1 мм. Зображення адаптовано з Paxinos and Franklin, 2001 [109].

2.7. Статистичний аналіз

Всі дані були представлені як середні значення±стандартна похибка середнього. Для статистичного аналізу використовували пакет програм StatSoft Statistica 6.0. Статистичну значущість відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою t-тесту Стьюдента (при $P < 0.05$ відмінності вважалися статистично значущими). Тривалість відновлення рефлексу випрямлення у контролі і безпосередньо після кожного удару протягом 5 днів порівнювали за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA).

РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Морфофункціональні зміни в головному мозку мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми

В наших дослідженнях ми використовували модель повторюваної легкої ЧМТ [85], яка є модифікацією класичної моделі з вільним падінням каліброваного вантажу на череп щура. При такому способі моделювання травми ознак переломів черепа і крововиливів у головному мозку (гематом) виявлено не було. Таким чином, використана у нашому дослідженні модель не відповідає тяжким формам пошкодження головного мозку. Водночас вимірювання латентного періода рефлексу випрямлення, поведінкові тести у «Відкритому полі» і Т-лабіринті та морфологічний аналіз показали, що у даній схемі експерименту травма все ж призводить до порушення як поведінкових характеристик тварин, так і структурних змін у головному мозку [110, 111].

3.1.1. Відновлення рефлексу випрямлення (righting reflex)

Щоб підтвердити порушення неврологічного стану тварин безпосередньо після удару, ми порівнювали час (сек), витрачений на відновлення рефлексу випрямлення у анестезованих контрольних і анестезованих травмованих мишей протягом п'яти днів після кожної наркотизації або удару (рис. 3.1). Статистична значущість відмінностей була показана при порівнянні показників контрольних і травмованих тварин ($P < 0.001$), тоді як відмінності між показниками в різні дні як у контрольних, так і у травмованих тварин, не були значущими. Таким

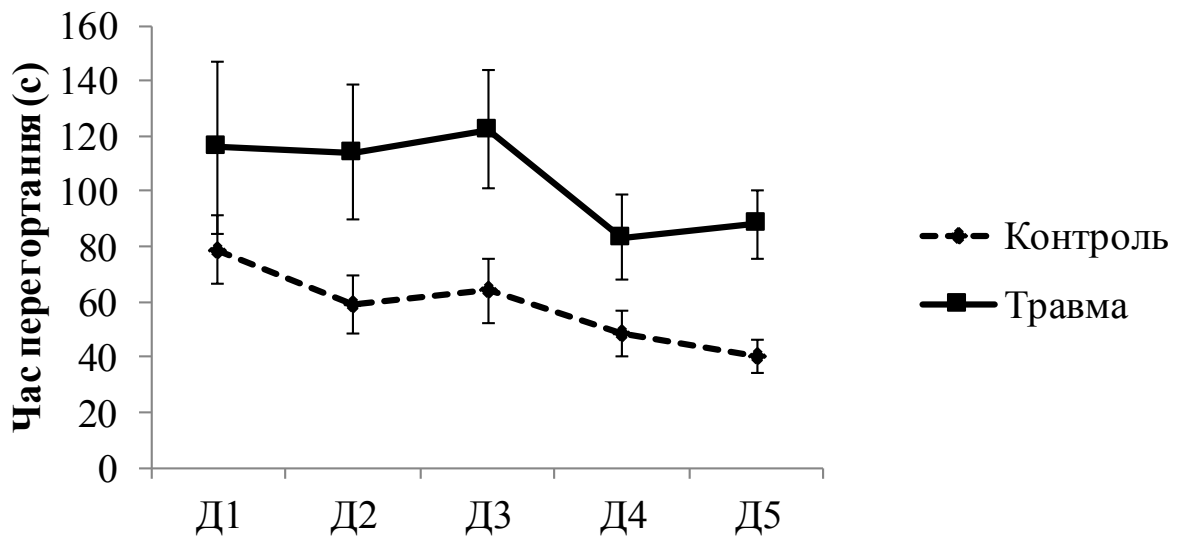


Рис. 3.1. Відновлення рефлексу випрямлення після інгаляційної наркотизації диетиловим ефіром у контрольних і травмованих мишей протягом п'яти послідовних днів. Результати – середнє значення±стандартна похибка середнього.

чином, отримання удару призводило до затримки повного відновлення свідомості.

3.1.2. Поведінкові тести у «Відкритому полі»

Результати тестування контрольних і травмованих мишей у «Відкритому полі» виявили тенденцію до зниження рухової активності на день 5, зростання її інтенсивності на день 10 і наближення до рівня контролю на день 30 (рис. 3.2). Статистично значущі відмінності були показані для груп неанестезованих контрольних і анестезованих травмованих мишей на день 5 ($P < 0.01$).

У відповідності до змін локомоторної активності, сумарна тривалість епізодів відпочинку мишей зростала на день 5 і наближалась до контрольних значень через місяць. Відмінності були статистично значущими для показників неанестезованих контрольних і травмованих тварин на день 5 ($P < 0.01$). Таким чином, у нашому експерименті

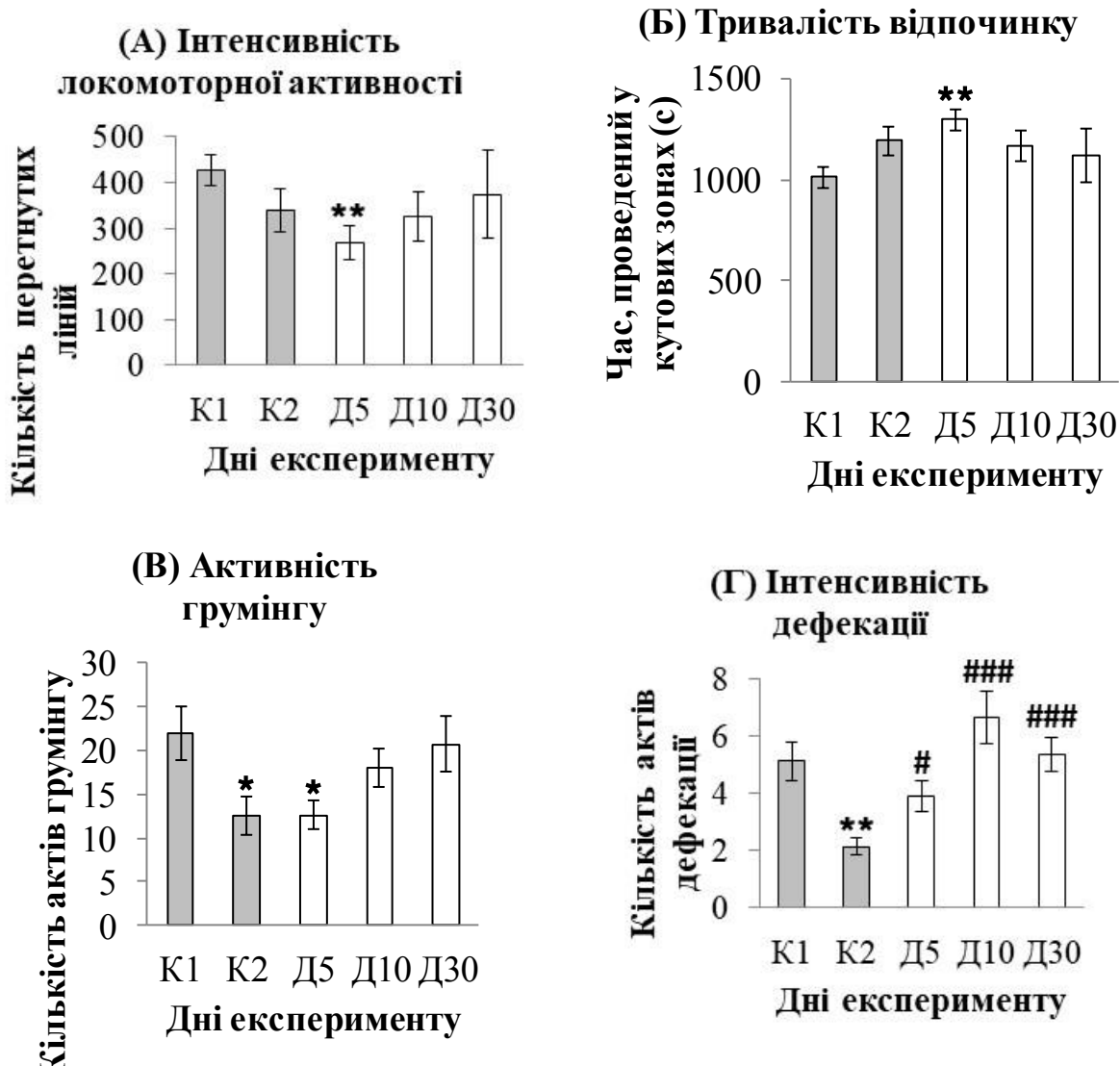


Рис. 3.2. Результати поведінкового тесту «Відкрите поле» у контролі (K1 – без анестезії, K2 – з анестезією), на день 5 (D5 – з анестезією), день 10 (D10) і день 30 (D30) від першого удару. * і ** – $P < 0.05$ і $P < 0.01$ у порівнянні з показниками неанестезованого контролю, # і ### – $P < 0.05$ і $P < 0.001$ у порівнянні з показниками анестезованого контролю. Показники на день 5 порівнювали з такими у анестезованому контролі. Результати представлені як середнє значення \pm стандартна похибка середнього.

травмовані миші перебували в стані відпочинку протягом більшого часу. Інтенсивність грумінгу на день 5 у травмованих мишей була значно нижчою, ніж у неанестезованої контрольної групи, але на одному рівні з показниками анестезованого контролю. Ми припускаємо, що анестезія впливає на вияви тривожності навіть у тварин без ЧМТ. На день 10 і 30

спостерігалось зростання кількості актів грумінгу. Статистично значущі відмінності були відмічені між показниками обох контрольних груп, а також між такими неанестезованих і травмованих мишей на день 5 після першої травматизації.

Кількість актів дефекації на день 5 у травмованих тварин була значно нижчою, ніж у неанестезованій контрольній групі, але у два рази вищою у порівнянні з показниками анестезованих контрольних тварин. Показники кількості актів дефекації на день 10 у травмованих мишей були вищими, порівняно з параметрами в обох контролях і травмованих мишей на день 5. На день 30 ці показники у травмованих тварин наблизились до значень неанестезованого контролю. Статистично значущі відмінності були виявлені у значеннях обох контролей, а також між показниками анестезованого контролю і групи травмованих мишей на дні 5, 10 і 30. Таким чином, слід вважати, що рівень тривожності зростає у травмованих тварин на дні 5 і 10 від дня першого удару, і відповідні характеристики повертаються до контрольних значень на день 30.

3.1.3. Поведінковий тест у Т-лабіринті

Тест на чергування вибору у Т-лабіринті використовується для визначення функції гіпокампа, наприклад, здатності до просторової орієнтації, а також для оцінки рівня тривожності. Функція гіпокампа вважається настільки непорушеною, наскільки високою є частка альтернативних виборів на противагу такої повторних виборів.

Середня відносна кількість альтернативних виборів порівнювали між контролем і тваринами після відтворення повторюваної легкої ЧМТ (рис 3.3). На день 5 від першої травми відбулось невелике зниження даного показника (53.97 ± 6.61), проте дані на день 10 (58.73 ± 4.67) наближались до

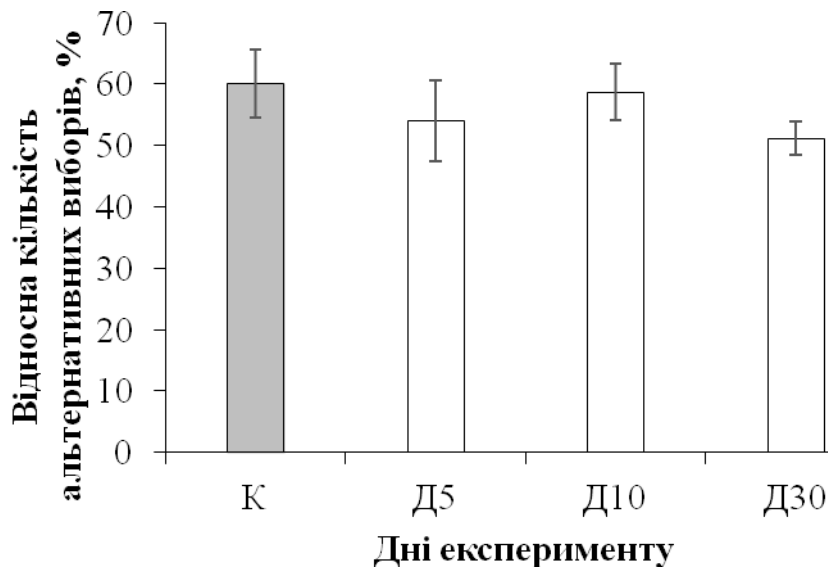


Рис. 3.3. Середній відсоток альтернативних виборів у Т-лабіринті у контролі (К), після повторюваної легкої ЧМТ на день 5 (Д5), день 10 (Д10) і день 30 (Д30) від першого удару. Результати представлені як середнє значення±стандартна похибка середнього.

рівня контролю. На день 30 (51.11 ± 2.72) спостерігали мінімальну середню кількість альтернативних виборів, що свідчить про тенденцію до зростання рівня тривожності і порушення просторової орієнтації. Відмінності між всіма виборками не були статистично значущими.

3.1.4. Виявлення ознак набряку головного мозку

Через 4 год після нанесення останнього з 5-ти ударів у мишей вилучали головний мозок для оцінки відносного вмісту води у ньому, порівняно з контролем (рис. 3.4). Головний мозок контрольних і травмованих тварин зважували до і після висушування у термостаті. Вміст води визначали за формулою: $(\text{мокра вага} - \text{суха вага}) / (\text{мокра вага}) \times 100$.

За результатами порівняння, значні відмінності знайдені не були. Отже, можна дійти висновку, що повторювана легка ЧМТ не призводила до розвитку істотного набряку тканин головного мозку.

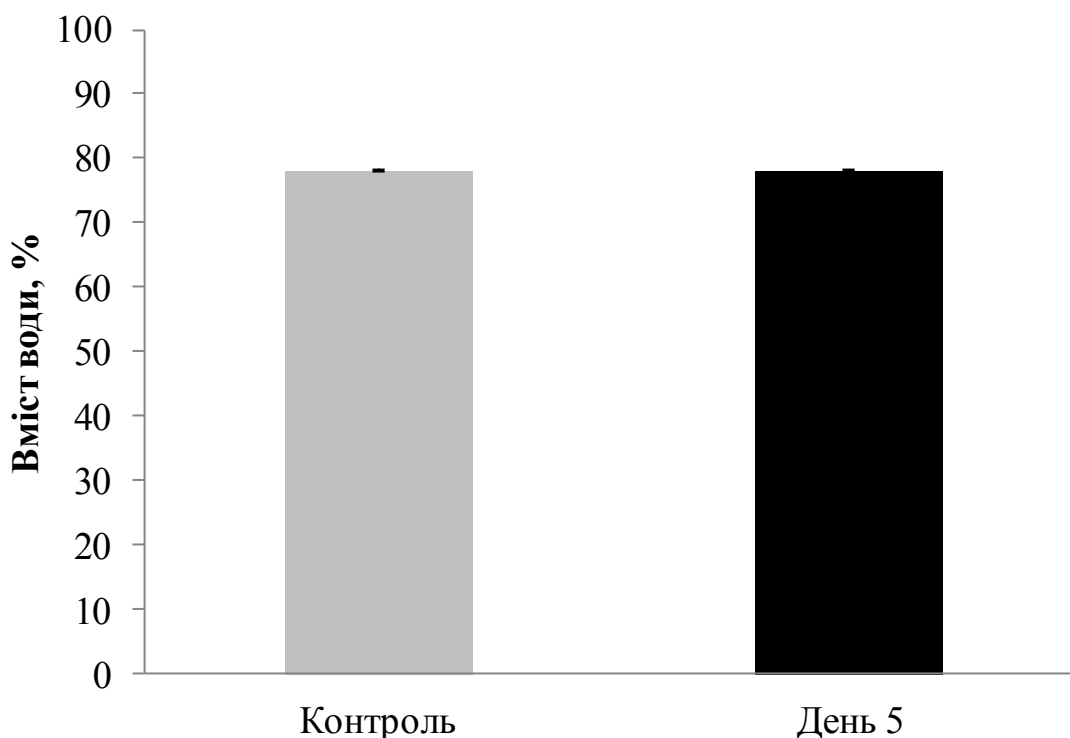


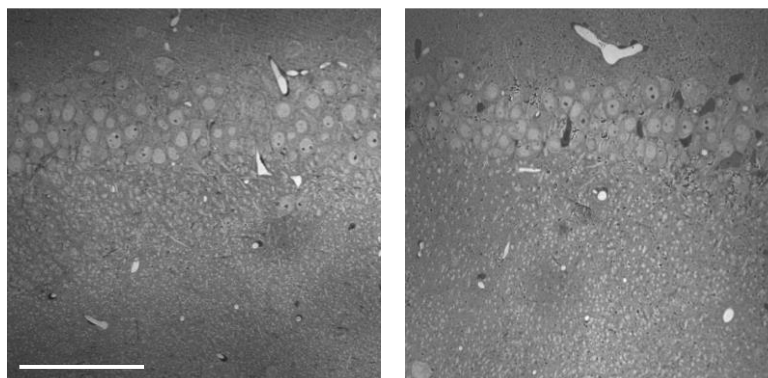
Рис. 3.4. Виявлення ознак едеми на день 5 від першого удару. Наявність едеми визначали, порівнюючи відсотковий вміст води у головному мозку контрольних і травмованих мишей. Результати – середнє значення±стандартна похибка середнього.

3.1.5. Характеристика нейронів у зрізах головного мозку після гістологічного забарвлення метиленовим синім

Коронарні зрізи головного мозку у контрольних і травмованих мишей (на день 5 від першого пошкодження) забарвлювали метиленовим синім для загальної морфологічної оцінки нейронів гіпокампа. Було виявлено, що в гіпокампі травмованих мишей виявляється вірогідно більше інтенсивно забарвлених нейронів у пірамідному шарі (рис. 3.5).

За підрахунками, середня кількість «темних» нейронів у зразках гіпокампа травмованих мишей (5.17 ± 1.24) майже на порядок перевищувала таку у контрольних тварин (0.57 ± 0.25 ; $P < 0.05$).

(А)



(Б)

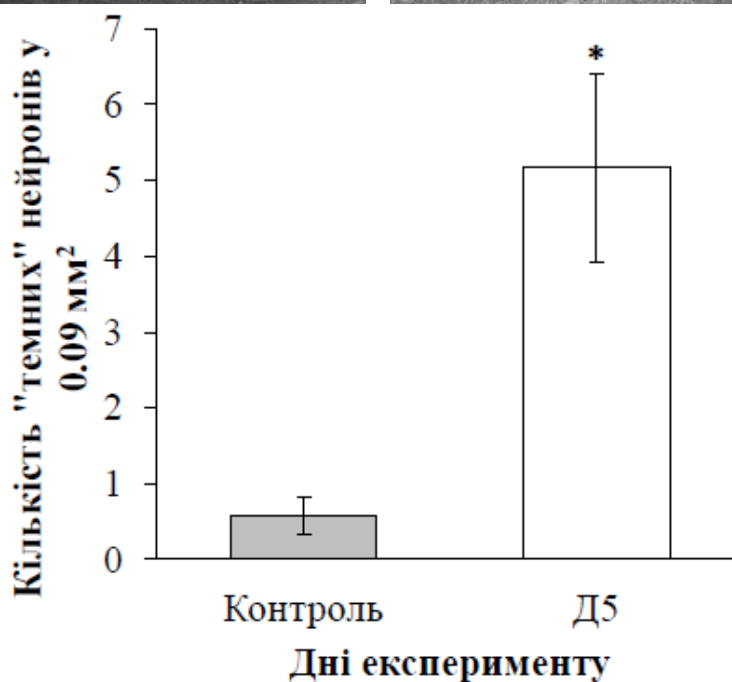


Рис. 3.5. *Зміни кількості «темних» нейронів у СА1-зоні гіпокампа у контролі та після відтворення повторюваної легкої ЧМТ (на день 5 від дня першого удару). А – фотографії СА1-зони гіпокампа. Шкала=100 μ т. Клітини рахували у 0.09 мм². Б – порівняльні підрахунки «темних» нейронів. * – $P < 0.05$ у порівнянні з контролем. Результати – середнє значення \pm стандартна похибка середнього.*

Очевидно, слід вважати, що поява подібних нейронів пояснюється помітним пошкодженням їх мембран, спричиненим каскадом подій внаслідок повторюваної легкої ЧМТ. Це істотно полегшує трансмембранне проникнення барвника. Внаслідок цього клітини набувають інтенсивнішого забарвлення, порівняно з клітинами, у яких плазматична мембрана зберегла цілісність, властиву для норми.

Для детальнішого вивчення стану нейронів після травми застосували електронну мікроскопію.

3.1.6. Характеристика нейронів у електронномікроскопічних зразках

Для виявлення ультраструктурних змін пірамідних нейронів ми проаналізували зображення у контрольних зрізах гіпокампа і в таких на день 5 від першої травми (рис. 3.6).

Щільне розташування нейронних сом і шари 5-6 клітин завтовшки відповідали класичним описам. Ядра мали рівномірно розподілений хроматин, у деяких були помітні ядерця. Цитоплазма містила добре розрізнявані органели: мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі (рис. 3.6, А).

У зразках гіпокампа після повторюваної легкої ЧМТ разом із «світлими» нейронами спостерігалися і «темні» [112]. Кількість останніх була вірогідно більшою, ніж у контролі. Відмінностями «темних» нейронів були щільніші ядро і цитоплазма, а також наявність числених темних везикул у цитоплазмі (рис. 3.6, Б).

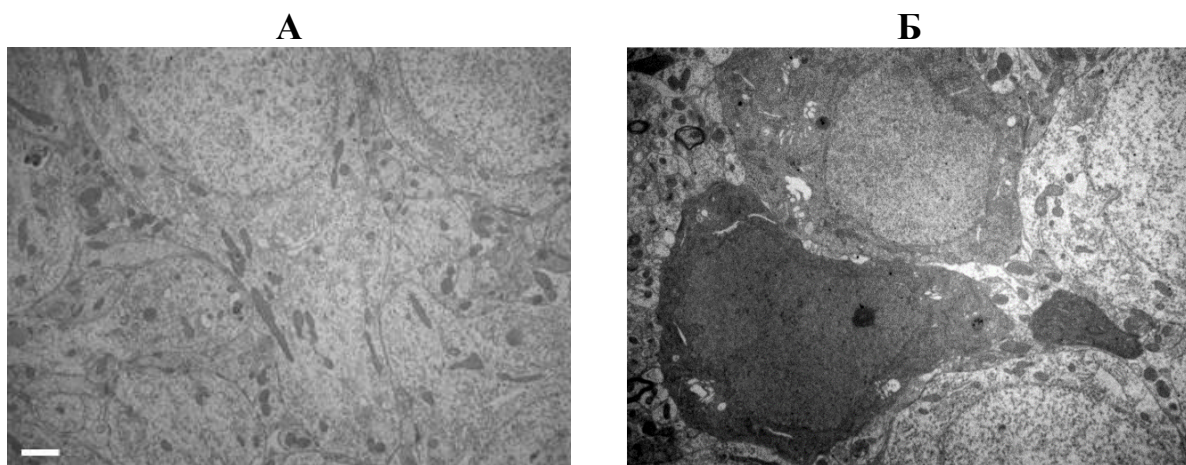


Рис. 3.6. Електронномікроскопічні зображення пірамідних нейронів СА1-зони гіпокампа у контролі (А) і на день 5 (Б) від першої травми. Шкала=1 μт.

3.1.7. Характеристика нейронів у зразках після імуногістохімічного забарвлення

Для візуалізації і оцінки кількості пірамідних нейронів СА1-зони гіпокампа використовували антитіла анти-NeuN, які специфічно мітять ядра нейронів (рис. 3.7). За результатами аналізу, середня кількість мічених клітин у травмованих мишей на день 5 від першого пошкодження (79.47 ± 2.33) була дещо вищою за таку у контролі (74.15 ± 2.37), проте відмінність не була статистично значущою.

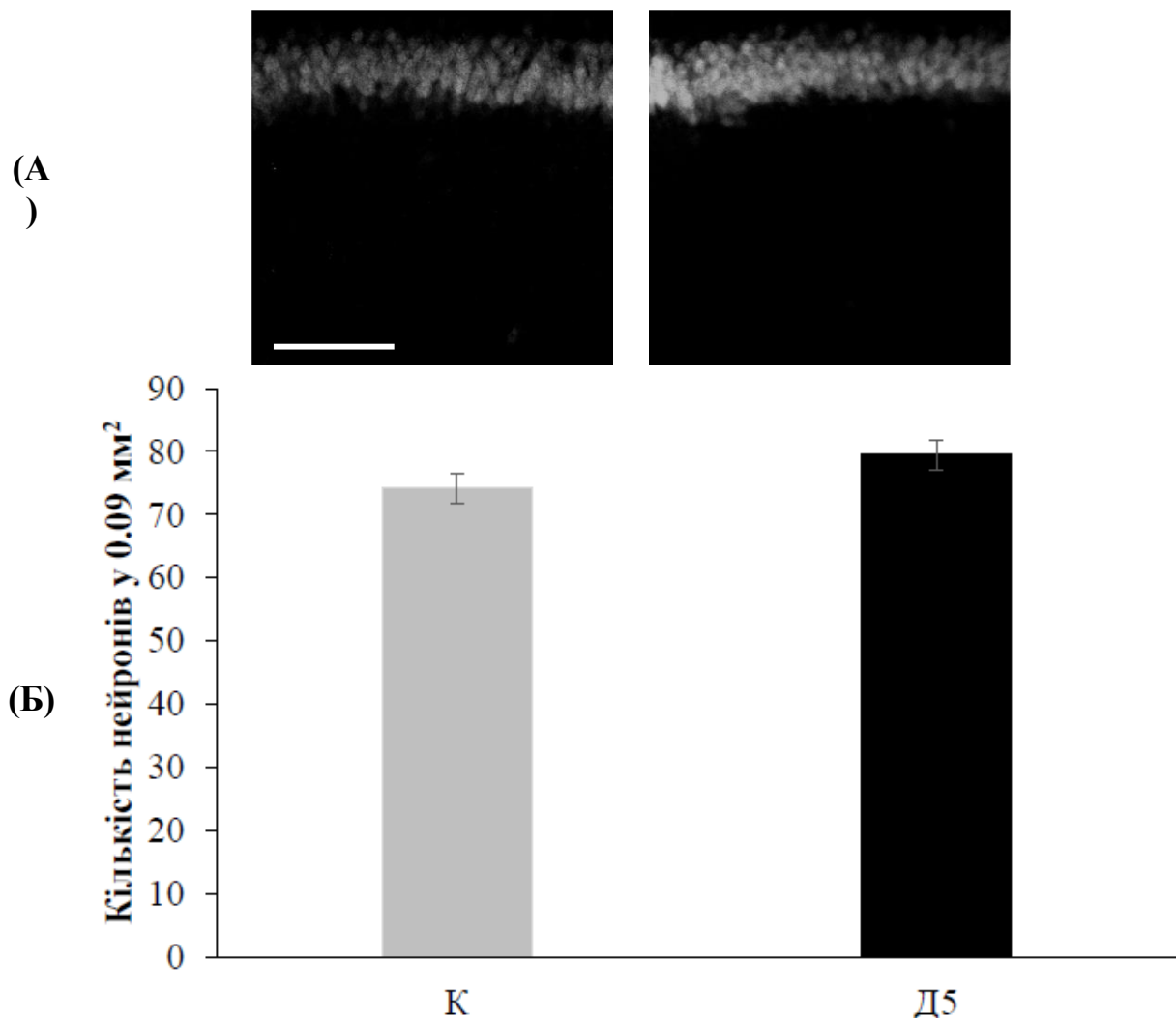


Рис. 3.7. Зміни кількості пірамідних нейронів у СА1-зоні гіпокампа у контролі та після відтворення повторюваної легкої ЧМТ (на день 5 від дня першого удару). А – фотографії СА1-зони гіпокампа. Шкала=100 μm . Клітини рахували у 0.09 мм². Б – порівняльні підрахунки нейронів. Результати – середнє значення \pm стандартна похибка середнього.

3.1.8. Характеристика астроцитів і клітин мікроглії у зразках після імуногістохімічного забарвлення

Результати імуногістохімічного аналізу свідчили про істотні зміни в стані глії внаслідок механічної травми голови, а саме про розвиток астро- (рис. 3.8) та мікрогліозу (рис. 3.9). Це проявлялося у поступовому зростанні кількості астроцитів і клітин мікроглії до дня 30.

Кількість активованих астроцитів також поступово зростала до дня 10, і такі показники зберігалися протягом місяця. Численні GFAP-позитивні астроцити знаходили в усіх шарах CA1-зони гіпокампа (*str. pyramidale*, *str. Radiatum* та *str. lacunosum-moleculare*). Таким чином,

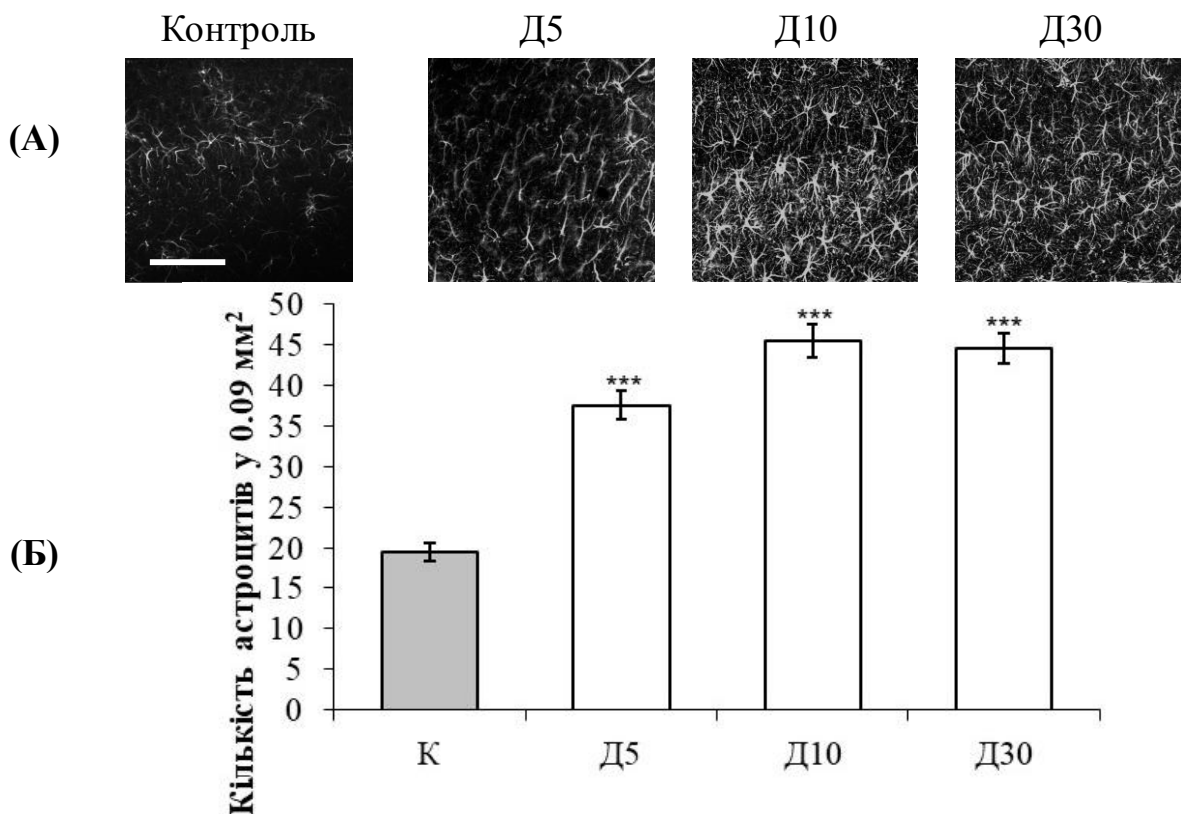


Рис. 3.8. Зміни кількості астроцитів у CA1-зоні гіпокампа у контролі, після відтворення повторюваної легкої ЧМТ (на день 5, 10 і 30 від дня першого удару). А – фотографії CA1-зони гіпокампа. Шкала=100 μ m. Клітини рахували у 0.09 мм². Б – порівняльні підрахунки астроцитів. *** – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем. Результати – середнє значення \pm стандартна похибка середнього.

спостерігався виражений реактивний астрогліоз у СА1-зоні гіпокампа. Окрім зростання кількості, астроцити зазнавали наступних змін: їх відростки потовщувались і вкорочувались, а об'єм соми збільшувався. Іншими словами, клітини зазнавали гіпертрофії.

Вивчення реакції мікроглії при ЧМТ виявило, що кількість мікрогліоцитів, порівняно з контролем (22.40 ± 0.74 , $P < 0.01$) зростала, і її показник на день 5 становить 48.00 ± 2.12 , на день 10 – 45.29 ± 1.89 , а на день 30 – 40.63 ± 2.043 , тобто протягом місяця кількість активованих клітин

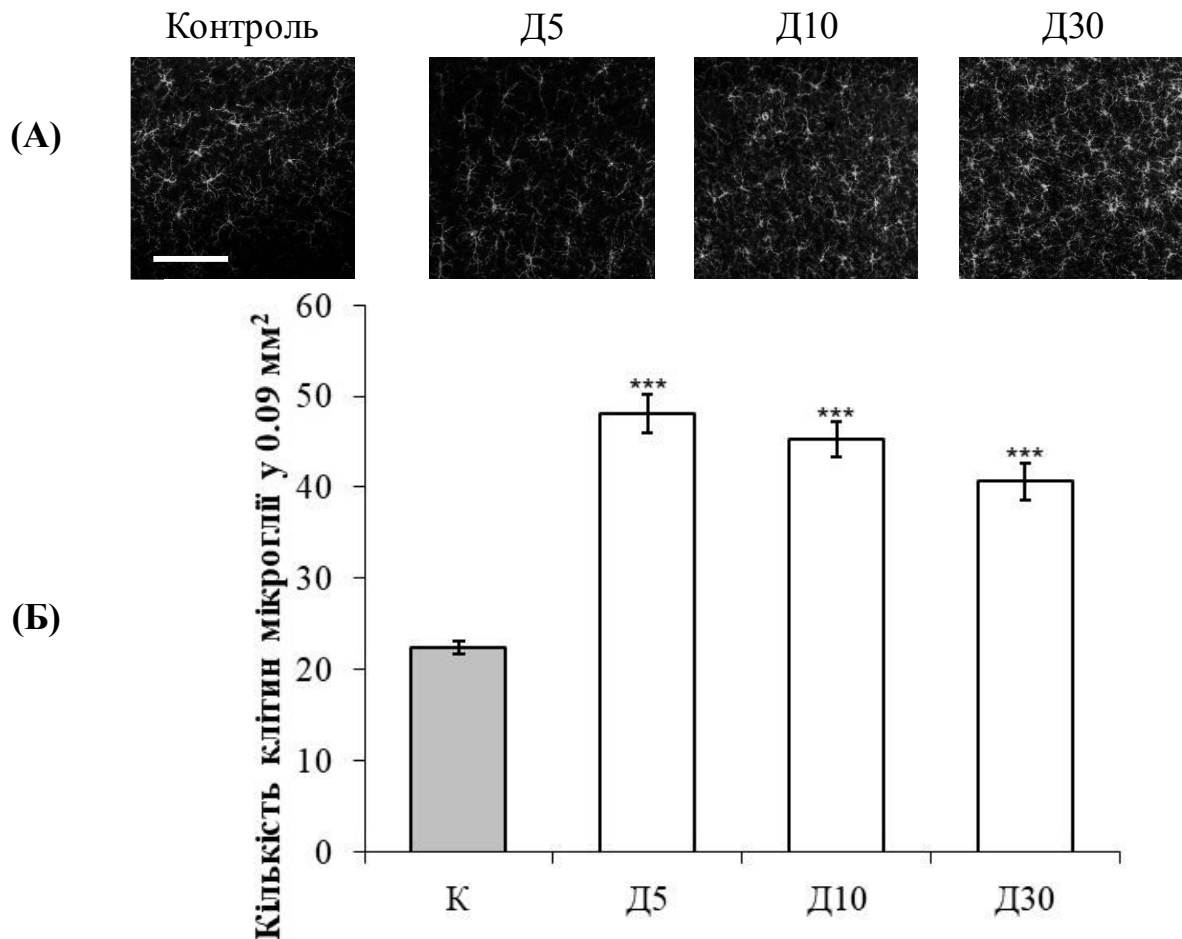


Рис. 3.9. Зміни кількості клітин мікроглії у СА1-зоні гіпокампа у контролі, після відтворення повторюваної легкої ЧМТ (на день 5, 10 і 30 від дня першого удару). А – фотографії СА1-зони гіпокампа. Шкала=100 μm . Клітини рахували у 0.09 mm^2 . Б – кількісні зміни клітин мікроглії. *** – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем. Результати – середнє значення \pm стандартна похибка середнього.

мікроглії падала. Iba1-позитивні клітини знаходили у всіх шарах CA1-ділянки гіпокампа. Морфологія мікрогліальних клітин змінювалась у порівнянні з такою у стані спокою (розгалуженою) на активовану (клітини амебоїдної форми). Активована мікроглія мала вкорочені та потовщені відростки, а також гіпертрофовану сому. Таким чином, в умовах повторюваної легкої ЧМТ спостерігали і астро-, і мікрогліоз, що вказує на розвиток запальних процесів у головному мозку внаслідок даного ураження.

Результати дослідження поведінкових і морфологічних характеристик мишей після повторюваної легкої ЧМТ показали, що у таких тварин підвищується рівень тривожності. Це в цілому відповідає наслідкам легкої ЧМТ у людини. Також ми спостерігали зниження локомоторної активності та збільшення часових інтервалів, необхідних травмованим тваринам для відпочинку. Можна заключити, що дана модель повторюваної легкої ЧМТ є перспективною для вивчення нейродегенеративних процесів, викликаних такою травмою, і пошуку засобів їх лікування.

3.2. Корекція морфофункціональних змін в головному мозку мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми корвітином

3.2.1. Поведінкові тести у «Відкритому полі»

Для визначення поведінкових змін у травмованих мишей після введення корвітину проводили тести у «Відкритому полі» (рис. 3.10, рис. 3.11). Зокрема, вимірювали такі характеристики, як інтенсивність локомоторної активності (кількість перетнутих ліній), тривалість відпочинку (час, проведений у кутових зонах), інтенсивність грумінгу

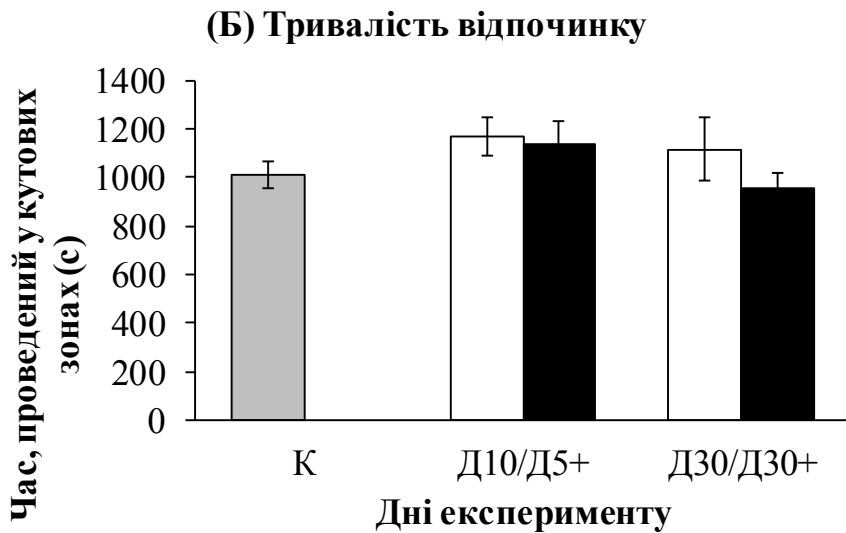
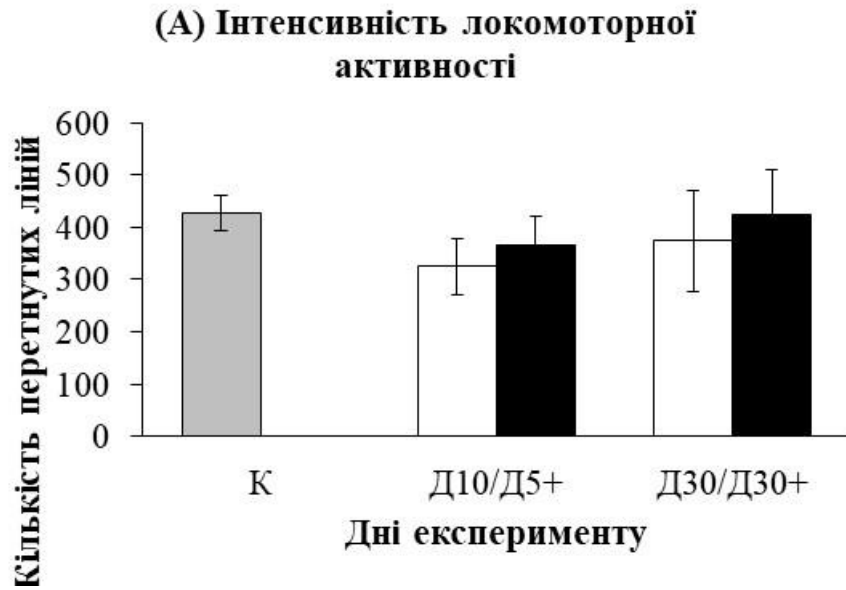
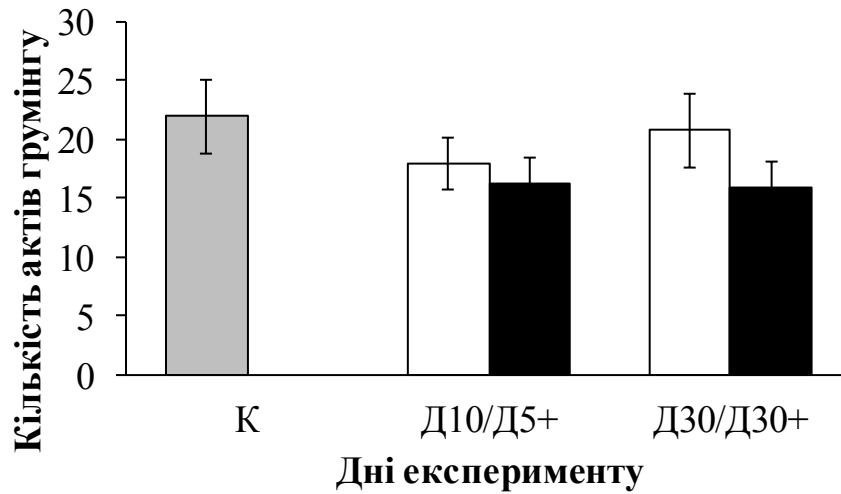


Рис. 3.10. *Результати поведінкового тесту «Відкрите поле» у контролі (К), після повторюваної легкої ЧМТ на день 5 (Д5), день 10 (Д10) і день 30 (Д30) від першого удару та після введення корвітину на день 5 (Д5+), 10 (Д10+) і 30 (Д30+) від першої ін'єкції. Результати представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього.*

(кількість актів грумінгу) і кількість актів дефекації. Порівняно із середніми значеннями показника локомоторної активності у травмованих мишей без введення корвітину (день 5 – 268.50 ± 37.73 , день 10 – 324.44 ± 54.35 , день 30 – 374.13 ± 96.40), після серії ін'єкцій даного препарату спостерігалось відновлення відповідних значень (день 5 – 366.89 ± 55.01 , день 10 – 406.00 ± 42 , день 30 – 425.00 ± 84.87), характерних

(В) Інтенсивність грумінгу



(Г) Інтенсивність дефекації

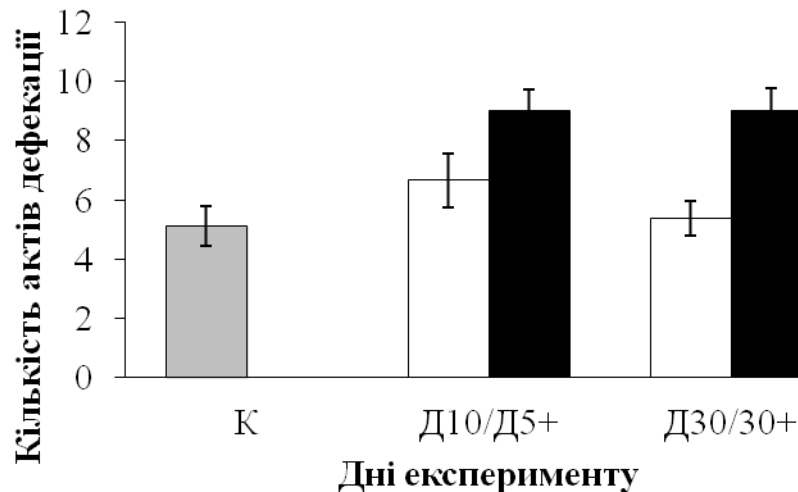


Рис. 3.11. Результати поведінкового тесту «Відкрите поле» у контролі (К), після повторюваної легкої ЧМТ на день 5 (Д5), день 10 (Д10) і день 30 (Д30) від першого удару та після введення корвітину на день 5 (Д5+), 10 (Д10+) і 30 (Д30+) від першої ін'єкції. Результати представлені як середнє значення±стандартна похибка середнього.

для контролю (426.63 ± 34.36). Такі міжгрупові відмінності не були статистично значущими і спостерігались як тенденція.

Відповідно, середня тривалість періодів відпочинку зростала на день 5 від першої травми (1298.60 ± 54.37) і поступово спадала протягом місяця (день 10 – 1167.00 ± 78.56 , день 30 – 1118.63 ± 132.04) до рівня контролю (1010.63 ± 54.37). Введення корвітину супроводжувалось зниженням даного

показника, порівняно із такими у травмованих мишей, і на день 30 від першої ін'єкції середнє значення було нижчим навіть за контроль. Міжгрупові відмінності не були статистично значущими.

Інтенсивність грумінгу після введення корвітину на день 5 від першої ін'єкції (16.22 ± 2.31) у середньому перевищувала таку у травмованих мишей на день 5 від першої травми (12.60 ± 1.60). На день 10 (17.00 ± 2.10) і день 30 (15.88 ± 2.21) цей показник дещо знизився і не перевищував середні значення у відповідних вибірках травмованих тварин без ін'єкцій (день 10 – 18.00 ± 2.23 , день 30 – 20.75 ± 3.12). Відмінності не були статистично значущими і спостерігались як тенденція.

Кількість актів дефекації в межах інтервалу спостереження після серії ін'єкцій корвітину з часом, навпаки, продовжувала зростати (день 5 – 4.67 ± 0.73 , день 10 – 4.56 ± 0.50 , день 30 – 6.13 ± 0.79) і перевищувала середні значення у травмованих мишей без введення корвітину у всі дні (день 5 – 3.90 ± 0.57 , день 10 – 6.67 ± 0.91 , день 30 – 5.38 ± 0.60), окрім 10-го (6.67 ± 0.91). Відмінності не були статистично значущими і спостерігались як тенденція.

3.2.2. Поведінковий тест у Т-лабіринті

Тест на чергування вибору у Т-лабіринті використовується для визначення рівня тривожності, а також функції гіпокампа, наприклад, здатності до просторової орієнтації. Функція гіпокампа вважається настільки непорушеною, наскільки високим є відносна кількість альтернативних виборів на противагу повторним.

За результатами порівняння (рис. 3.12), середні значення цієї кількості після введення корвітину (день 10 – 69.84 ± 6.73 , день 30 – 66.67 ± 8.04) перевищували такі у травмованих мишей (день 5 – 53.97 ± 6.61 ,

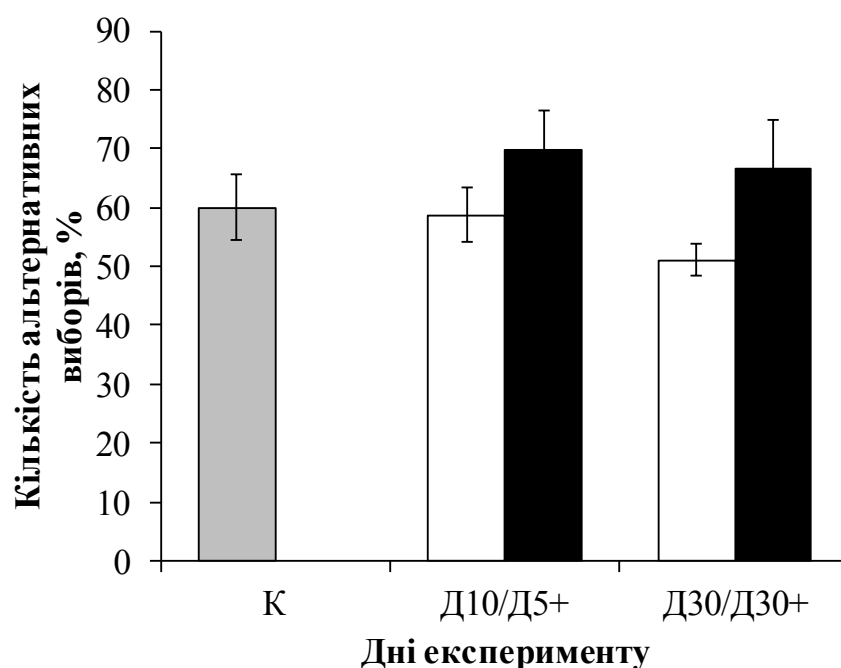


Рис. 3.12. Середній відсоток альтернативних виборів у Т-лабіринті у контролі (К), після повторюваної легкої ЧМТ на день 5 (Д5), день 10 (Д10) і день 30 (Д30) від першого удару та після введення корвітину на день 5 (Д5+), 10 (Д10+) і 30 (Д30+) від першої ін'єкції. Результати представлені середнє значення±стандартна похибка середнього.

день 10 – 58.73±4.67, день 30 – 51.11±2.72) і навіть у контрольних (60.00±5.54). Проте відмінності не були статистично значущими.

3.2.3. Характеристика астроцитів і клітин мікроглії у зразках після імуногістохімічного забарвлення

Ін'єкції корвітину травмованим мишам призвели до пригнічення астро- та мікрогліозу (рис. 3.13, рис. 3.14) [113]. Кількісний та якісний аналіз відповідних клітин проводили для зразків головного мозку на дні 5, 10 та 30 від першої травми, а також на дні 5, 10 та 30 від першої ін'єкції. Послаблення реактивного астрогліозу проявлялось у зменшенні кількості

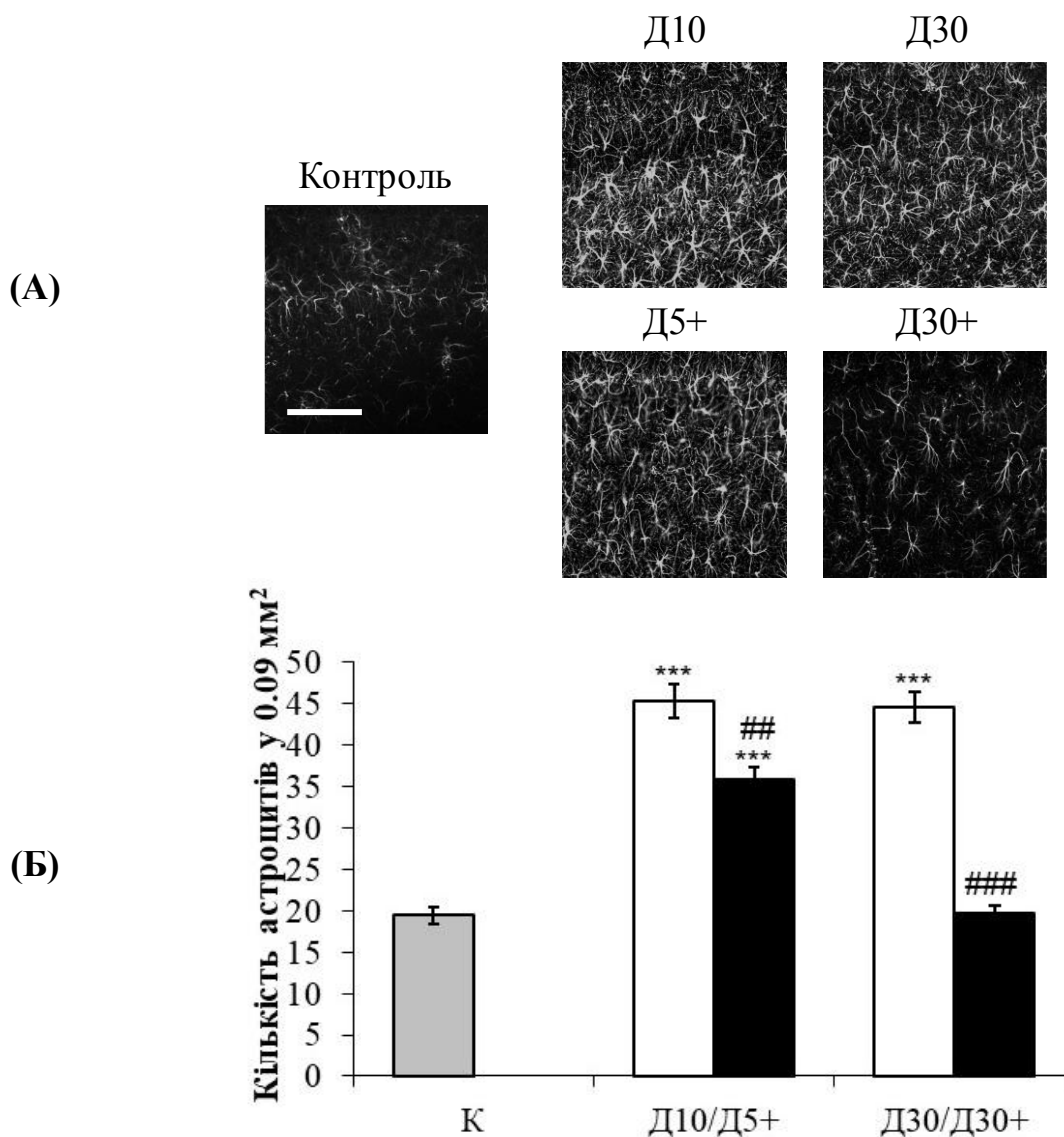


Рис. 3.13. Зміни кількості астроцитів у СА1-зоні гіпокампа у контролі, після відтворення повторюваної легкої ЧМТ (на день 5, 10 і 30 від дня першого удару) і після введення корвітину (на день 5, 10 і 30 від першої ін'єкції).

А – фотографії СА1-зони гіпокампа. Шкала=100 μm . Клітини рахували у 0.09 mm^2 . Б – порівняльні підрахунки астроцитів. * і *** – $P < 0.05$ і $P < 0.001$ у порівнянні з контролем, ### – $P < 0.001$ у порівнянні всередині кожної пари стовпчиків. Результати – середнє значення \pm стандартна похибка середнього.

ідентифікованих астроцитів, яка на день 30 (19.77 ± 0.89) повернулася до рівня контролю (19.44 ± 4.45) (рис. 3.13). Середня кількість астроцитів у тест-зоні становила 35.82 ± 1.43 на день 5, 23.36 ± 2.04 – на день 10 і 19.77 ± 0.89 – на день 30. Серед груп з повторюваною легкою ЧМТ та такою

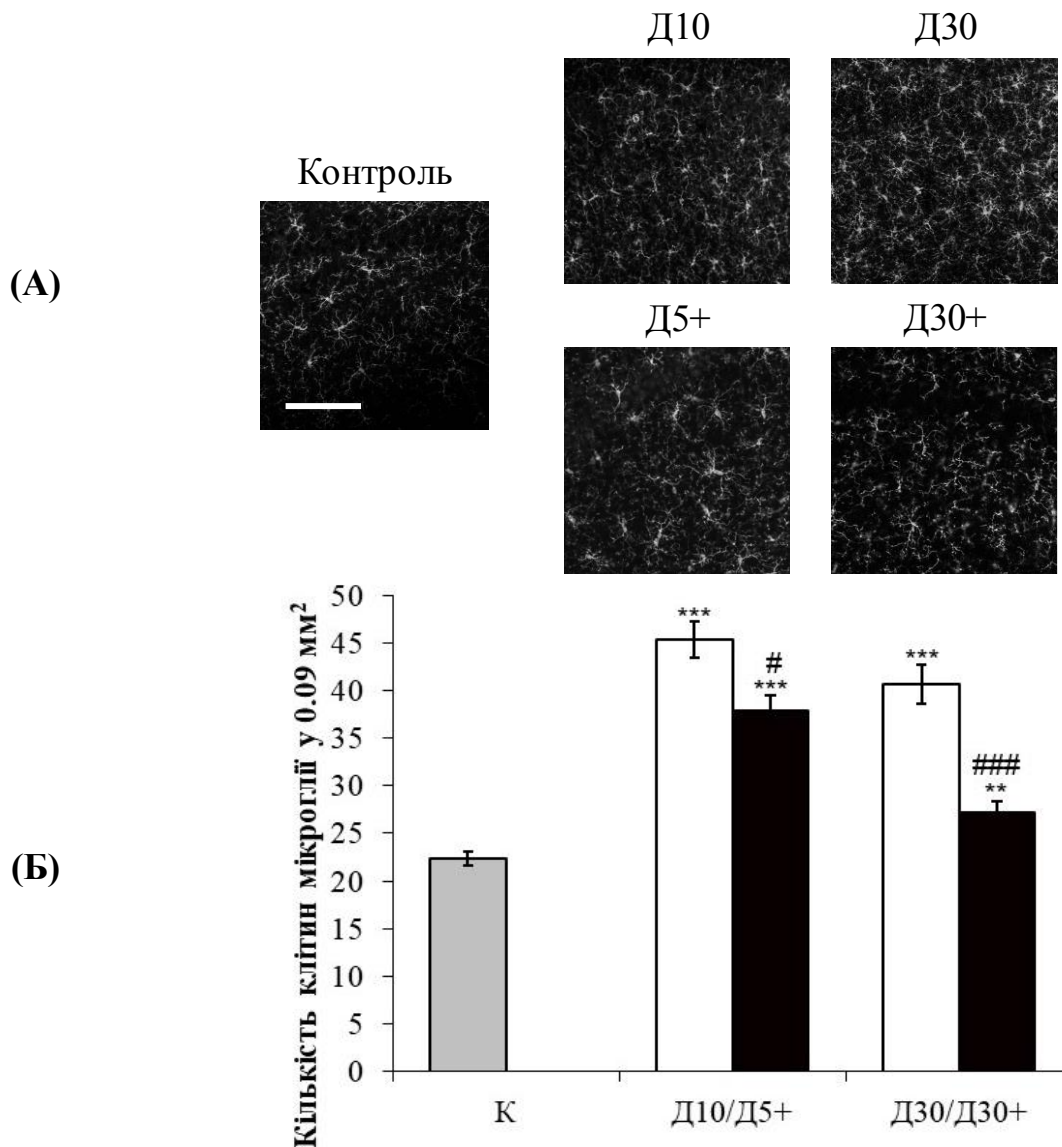


Рис. 3.14. Зміни кількості клітин мікроглії у СА1-зоні гіпокампа у контролі, після відтворення повторюваної легкої ЧМТ (на день 5, 10 і 30 від дня першого удару) і після введення корвітину (на день 5, 10 і 30 від першої ін'єкції).

А – фотографії СА1-зони гіпокампа. Шкала=100 μm. Клітини рахували у 0.09 мм². Б – порівняльні підрахунки клітин мікроглії. ** і *** – $P < 0.01$ і $P < 0.001$ у порівнянні з контролем, ##, ### – $P < 0.01$ і $P < 0.001$ у порівнянні всередині кожної пари стовпчиків. Результати – середнє значення ± стандартна похибка середнього.

ж, але після введення корвітину статистично значущу різницю було показано для групи на день 10 та на день 30 ($P < 0.001$). Таким чином, кількість астроцитів після введення корвітину зменшувалася.

Зниження мікрогліозу було менш помітним, ніж таке астрогліозу (рис. 3.14). Кількість клітин мікроглії на день 5 від першої ін'єкції корвітину (37.89 ± 1.65) була нижчою, ніж на день 5 від дня першої травми (48.00 ± 2.12). До дня 10 (32.27 ± 1.02) показники продовжували знижуватись, і мінімальна кількість становила 27.18 ± 1.16 (день 30). Статистично значущими відмінності були між групами мишей на день 5 від першої травми і таких на день 5 від першої ін'єкції ($P < 0.01$), а також між групами тварин на день 10 і день 30 з ін'єкціями корвітину і травмованих мишей без застосування препарату ($P < 0.001$).

Введення корвітину в умовах повторюваної легкої ЧМТ призводило до зниження як астрогліозу, так і, у дещо меншій мірі, мікрогліозу, що проявлялось у зменшенні кількості відповідних клітин, тоді як їх форма свідчила про те, що запальні процеси продовжують відбуватись. Отже, наслідком застосування корвітину було послаблення запалення. Проте для досягнення його максимальної ефективності необхідні подальші дослідження, наприклад, такі, у яких вивчалась би залежність ефекту від концентрації препарату, а також схеми його введення.

РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

За результатами нашого дослідження, повторювана легка ЧМТ суроводжується морфофункціональними змінами головного мозку навіть через короткі проміжки часу після її відтворення.

Зокрема у СА1-зоні гіпокампа спостерігали розвиток астро- та мікрогліозу. Крім цього, у гістологічних зразках головного мозку травмованих мишей виявили нейрони із підвищеною інтенсивністю забарвлення метиленовим синім, а в електронномікроскопічних препаратах – ущільнені нейрони. Ймовірно ці клітини стали на шлях загибелі. При цьому в експериментальних тварин не фіксували переломів черепа, крововиливів у головному мозку та ознак його набряку. Отже, травму не можна вважати тяжкою або такою, що відповідає середньому рівню тяжкості.

Визначивши наслідки повторюваної легкої ЧМТ і переконавшись у доцільності їх лікування, ми застосували препарат корвітин, який є водорозчинним комплексом біофалаваноїду кверцетину і полівінілпіролідону. Ефективність кверцетину було показано у попередніх дослідженнях, наприклад, в умовах ішемії головного мозку [102], при спинномозковій травмі [100, 101], а також при ЧМТ середнього рівня тяжкості [99].

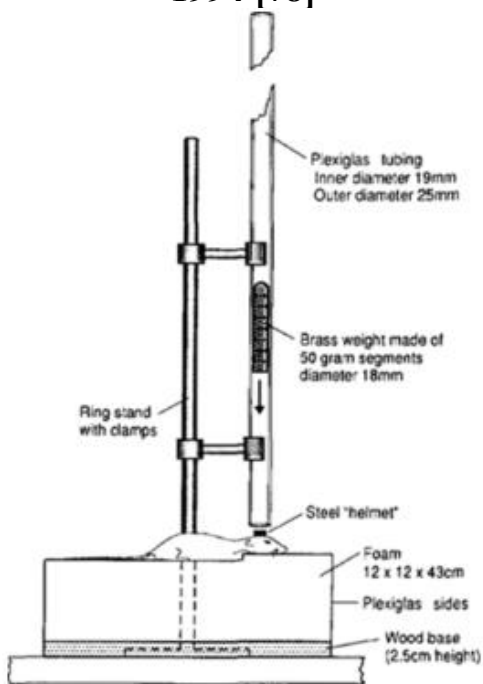
Після введення корвітину травмованим мишам ми спостерігали гальмування астро- та мікрогліозу, отже цей препарат має нейропротективний ефект.

4.1. Модель повторюваної легкої черепно-мозкової травми

Повторювану легку ЧМТ відтворювали згідно з методикою Kane et al [85], яка є модифікацією моделі вільного падіння вантажу за Marmarou et al (рис. 4.1) [78, 79, 114, 115]. Останню було змінено так, щоб наблизити експериментальні умови отримання травми до реальних, а також знизити смертність тварин. Крім цього, у класичній моделі вільного падіння вантажу використовували щурів, а не мишей. Обидві методики передбачають закриту дифузну ЧМТ.

За Marmarou et al [78], Анестезованим щурам попередньо прикріплювали до твердої оболонки головного мозку металевий диск. Маса вантажу становила 450 г, його спускали вертикальною направляючою трубкою з висоти 2 м. Смертність тварин складала 44% при частоті переломів черепа 12.5%. Удар супроводжувався апное, конвульсивними нападами та помірною гіпертонією.

(A) Модель Marmarou et al, 1994 [78]



(B) Модель Kane et al, 2012 [85]

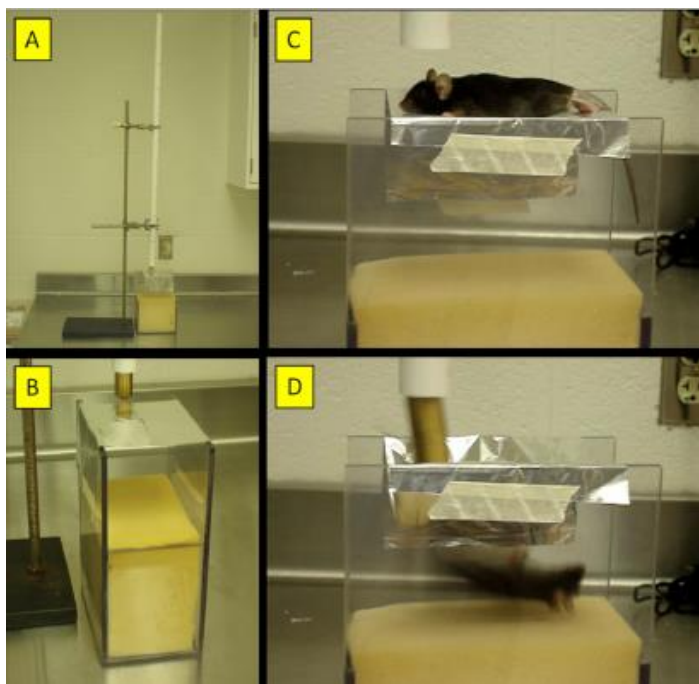


Рис. 4.1. Порівняння апаратів для відтворення ЧМТ.

Метою Kane et al [85] було пристосувати дану модель для відтворення повторюваної легкої ЧМТ у мишей. Отже масу вантажу було змінено з 450 г на 95 г, висоту його спуску – з 2 м на 1 м, а шкіра голови, череп і тверда оболонка головного мозку не піддавались хірургічним маніпуляціям. На додачу, лабораторні тварини розміщувались не на амортизуючій підставці, а на фрагменті фольги, прикріпленому вище, тобто за рахунок падіння головний мозок мишей зазнавав кутового прискорення, характерного для струсу головного мозку. У тварин майже не фіксували переломів черепа, крововиливів і набряку у головного мозку. Також були відсутні випадки судомних нападів і паралічу.

Наші спостереження відповідали таким, описаними Kane et al [85].

Як відомо, у людини тяжкість ЧМТ визначається за 15-бальною шкалою GCS [52]. Індикаторами тяжкості травми згідно з цією шкалою є порушення свідомості, втрата свідомості та пост-травматична амнезія. 12-15 балів відповідають легкій травмі (*mild*), 9-12 – помірній (*moderate*), 8 та менше – тяжкій (*severe*) [116]. Кількість балів встановлюють, оцінюючи зорові, вербальні та рухові реакції [117].

У дослідженнях із лабораторними тваринами така оцінка тяжкості ЧМТ є неможливою, а загальноприйнята шкала, розроблена для експериментальних умов, наразі у наукових джерелах не описана. Одним з підходів до оцінки наслідків ЧМТ є Neurological Severity Score (NSS) [118]. Це 10-бальна шкала, за якою максимальна кількість балів відповідає найвищому рівню тяжкості. Його встановлюють за наступними ознаками:

- 1) наявність моно- або геміпарезу – 1 бал;
- 2) нездатність пройти перекладиною, що має ширину 3 см – 1 бал;
- 3) нездатність пройти перекладиною, що має ширину 2 см – 1 бал;

- 4) нездатність пройти перекладиною, що має ширину 1 см – 1 бал;
- 5) нездатність зберігати рівновагу на перекладині завширшки 1 см – 1 бал;
- 6) нездатність зберігати рівновагу на круглій палці завширшки 1 см – 1 бал;
- 7) невдача при виході з кола діаметром 30 см (за 2 хв) – 1 бал;
- 8) нездатність пересуватись прямо – 1 бал;
- 9) втрата орієнтувальної поведінки (startle behavior) – 1 бал;
- 10) втрата пошукової поведінки (seeking behavior) – 1 бал.

Однак дослідники здебільшого покладаються на параметри нанесення травми у поєднанні з функціональними тестами та гістологічними даними [42, 119-122].

У нашому дослідженні не спостерігалось ознак переломів черепа, набряку та крововиливу у головному мозку, отже травму не можна вважати тяжкою. Проте у мишей було виявлено достовірне збільшення тривалості латентного періоду рефлекса випрямлення безпосередньо після нанесення удару, а також морфологічні зміни, такі як розвиток астро- і мікрогліозу та збільшення кількості «темних нейронів». Відповідно, пошкодження мало місце.

4.2. Нейрологічний стан та поведінкові зміни у мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми

4.2.1. Відновлення рефлексу випрямлення

Для оцінки поведінкових характеристик після повторюваної легкої ЧМТ ми проводили тести у «Відкритому полі» та Т-лабіринті у контролі,

на день 5, день 10 і день 30 від першого механічного пошкодження. Також за тривалістю латентного періоду рефлексу випрямлення визначали нейрологічний стан мишей безпосередньо після кожного удару.

Нанесення травми супроводжувалося значним подовженням латентного періоду рефлексу випрямлення, тобто спостерігали затримку у відновленні тваринами нормального положення тіла після перевертання, порівняно з контролем. Ці дані зугоджуються з такими у дослідженні Kane et al [85].

Shandra et al також використовували цей показник, вивчаючи вплив повторюваної дифузної легкої ЧМТ на реакцію астроцитів та ймовірність пост-травматичної епілепсії [68]. Експерименти проводили і з самцями, і з самками мишей. Дослідники відкалібрували модель Marmarou et al [78] для нанесення легкої травми. Таким чином, маса вантажу становила 100 г, а висота його спуску – 50 см, 60 см і 70 см. Миші отримували механічне пошкодження по три рази з інтервалом 45 хв. Латентний період рефлексу випрямлення після одного або трьох ударів з висоти 50 см не відрізнявся для самців і самок, але став істотно тривалішим для самок при одноразовому падінні вантажу з висоти 60 см. Незалежно від статі найдовше рефлекс випрямлення відновлювався після трьох ударів з висоти 50 см.

За нашими результатами, між значеннями цього показника у різні дні, тобто такими, що відповідають різним кількостям ударів, не було достовірних відмінностей, однак такі відмінності мали місце при порівнянні значень у контрольних і травмованих мишей. Ймовірно на тривалість латентного періоду рефлексу випрямлення також вплинула інгаляційна анестезія диетиловим ефіром, і це могло призвести до певної часової непослідовності показників.

4.2.2. Результати поведінкових тестів у «Відкритому полі» і Т-лабіринті

У «Відкритому полі» ми оцінювали такі поведінкові параметри, як локомоторна активність та рівень тривожності. Враховуючи ймовірний вплив анестезії на результати тесту, ми ввели додатковий контроль. Експериментальним тваринам з цієї групи не наносили механічних пошкоджень, але піддавали наркотизації перед тестуванням. Значення у контрольних груп ненаркотизованих і наркотизованих мишей не мали достовірних відмінностей при дослідженні локомоторної активності, але відрізнялись при порівнянні кількості актів дефекації. У травмованих мишей на день 5 рівень локомоторної активності достовірно падав, порівняно зі значеннями контрольної неанестезованої групи, а тривалість відпочинку достовірно зростала. Інтенсивність грумінгу у травмованих мишей на день 5 достовірно падала, а кількість актів дефекації помітно зростала у порівнянні зі значеннями контрольних анестезованих мишей і дещо менше порівняно з такими без наркотизації. Кількість актів дефекації у травмованих мишей була максимальною на день 10 і на день 30 наближалась до показників неанестезованого контролю. Тобто кількість актів дефекації у анестезованих контрольних тварин була значно нижчою, ніж у неанестезованих.

Т-лабіринт використовували для визначення функціонального стану гіпокампа та рівня тривожності, які оцінювали за відносною кількістю альтернативних виборів. Ми спостерігали помірне зниження цього показника після відтворення повторюваної легкої ЧМТ, однак відмінності між групами контрольних і травмованих тварин на день 5, день 10 і день 30 значущими не були.

Цікаво, що у Kane et al [85] за тих самих параметрів нанесення травми, як і в нашому дослідженні, повторювана легка ЧМТ

супроводжувалась значним посиленням локомоторної активності, тоді як ми спостерігали її зниження. Вчені пов'язали свої знахідки із тим, що у клінічних умовах ЧМТ супроводжується порушенням уваги та розвитком гіперактивності, зокрема у дітей [123]. Homsí et al також отримали дані про зростання локомоторної активності після поодинокі закритої ЧМТ у мишей [124]. Cheng et al моделювали повторювану легку ЧМТ у фронтальній ділянці головного мозку, адаптувавши один з різновидів контрольованого кіркового пошкодження [125]. Змін локомоторної активності, порівняно з нетравмованими мишами, не спостерігали. Ghadiri et al зафіксували зниження локомоторної активності у мишей через 24 год після нанесення легкої травми та її наближення до значень у нетравмованих мишей через 48 год [126].

Отже дані щодо впливу ЧМТ на локомоторну активність експериментальних тварин є неоднорідними і дещо суперечливими.

Тривалість відпочинку є показником, який має обернену залежність від рівня локомоторної активності, і, за нашими результатами, перша достовірно зростала на день 5.

Вивчаючи зміни інтенсивності грумінгу у мишей після повторюваної легкої ЧМТ, ми підраховували такі його акти, як почісування та вмивання. Відомо, що стресори (нове середовище, присутність хижака тощо) здатні модулювати активність грумінгу [127, 128]. Angoa-Perez et al виявили зниження сумарної тривалості актів грумінгу після повторюваної легкої ЧМТ у так званому сплеш-тесті (*splash test*) [129]. Цей тест передбачає сприскнування на хутро мишей 10% цукрози, щоб спровокувати грумінг [130]. На думку авторів [129], подібна зміна пояснюється розвитком депресивної поведінки. Депресія і тривожні розлади, у свою чергу, пов'язують із дисфункцією гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової осі та структурними змінами гіпокампа [130-132].

Ми спостерігали достовірне зниження кількості актів грумінгу у травмованих мишей на день 5, що зугоджується з даними Angoa-Perez et al [129] і може бути ознакою розвитку депресивної поведінки. Не виключено, що це пояснює і зниження локомоторної активності після травми.

У методиках поведінкового тестування частоту дефекації вважають корелятом тривоги та страху [103, 133]. Нами було відмічено зростання кількості актів дефекації у травмованих мишей на день 5, день 10 і день 30, порівняно з анестезованим контролем. Цей показник у анестезованої контрольної групи був нижчим за такий у неанестезованої, і на день 5 середня кількість актів дефекації у мишей з повторюваною легкою ЧМТ була нижчою, ніж в неанестезованому контролі, однак відмінність у цій парі порівняння не була статистично значущою.

Pandey et al досліджували депресивну та тривожну поведінку у щурів як наслідок легкої ЧМТ [134]. Травму було нанесено за Margrou et al [78]. Автори помітили суттєве зростання інтенсивності дефекації після травми, порівняно зі значеннями нетравмованих щурів. Значення цього показника узгоджувались із результатами інших тестів, які було проведено у даному дослідженні. Відповідно, науковці зробили висновок про наявність ознак депресивної і тривожної поведінки внаслідок легкої ЧМТ.

Для визначення поведінкових параметрів, пов'язаних із функцією гіпокампа, ми застосували один з різновидів тесту у Т-лабіринті, а саме тест на спонтанне чергування. Істотні зміни відносної кількості альтернативних виборів у травмованих мишей місце не мали.

Отже повторювана легка ЧМТ супроводжувалась порушенням нейрологічного стану мишей, що проявлялось у подовженні латентного періоду рефлексу випрямлення. Крім цього, відбувалось гальмування локомоторної активності та інтенсивності грумінгу, тоді як кількість актів дефекації зростала. Ймовірно отримані нами результати свідчать про наявність ознак депресивної та тривожної поведінки, які, однак, не

характеризувались стійкістю у часі, тобто використана нами модель пошкодження головного мозку не відповідає тяжким поведінковим наслідкам.

4.3. Морфологічні зміни у головному мозку мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми

При повторюваній легкій ЧМТ у мишей не спостерігали ознак переломів черепа, набряку та крововиливів у головному мозку, однак імуногістохімічні дані свідчили про розвиток астро- та мікрогліозу. Отже механічне пошкодження супроводжувалося запальними процесами. Крім цього, було зафіксовано зростання кількості «темних» нейронів у пірамідному шарі CA1-зони гіпокампа. У тій же ділянці в електронномікроскопічних препаратах було відмечено наявність ущільнених нейронів.

Відомо, що гіпокамп, зокрема CA1-зона, є вразливим до метаболічного стресу, наприклад, при таких нейрологічних розладах, як ішемія, лімбічний енцефаліт, гіпоглікемічна енцефалопатія, епілепсія, розсіяний склероз, транзиторна глобальна амнезія, хвороба Альцгеймера тощо [135, 136]. Його чутливість також проявляється за хронічного стресу та під час старіння. Вибіркову загибель нейронів CA1-зони було показано в умовах ішемії головного мозку [137, 138]. У той же час у CA3-зоні, зубчастій звивині та корі вони характеризувалися більшою стійкістю.

З цієї причини CA1-зона гіпокампа була ключовою структурою у нашому дослідженні.

4.3.1. Структурні зміни пірамідних нейронів гіпокампальної CA1-зони мишей після повторюваної легкої ЧМТ

Структурні зміни пірамідних нейронів у CA1-зоні гіпокампа після повторюваної легкої ЧМТ вивчали за допомогою гістологічного забарвлення метиленовим синім, електронної мікроскопії та імунофлуоресцентного методу (мічення нейронних ядер антитілами анти-NeuN). У препаратах, забарвлених метиленовим синім, відбулося збільшення кількості «темних» нейронів пірамідного шару. Електронномікроскопічні зразки містили електроннощільні нейрони в тій же ділянці, що свідчить про їх можливе становлення на шлях загибелі. Імунофлуоресцентно забарвлені зрізи використовували для кількісного аналізу, і відмінностей у кількості нейронних ядер у пірамідному шарі CA1-зони гіпокампа контрольних і травмованих мишей на день 5 помічено не було.

Ghadiri et al визначали ступінь ушкодження нейронів внаслідок локальної легкої та помірної ЧМТ у щурів за появою клітин із інтенсивно забарвленими ядрами та яскравою цитоплазмою [126]. Ці клітини дослідники також називали темними нейронами (*dark neurons*). Препарати забарвлювали крезилем фіолетовим за Нісслем. Механічне пошкодження призвело до істотного збільшення їх кількості у гіпокампальних зонах CA1 та CA3 через 72 год і 14 днів після удару. На день 14 середнє значення цього показника знижувалося у порівнянні з таким через 72 год.

За Ishida et al, темні нейрони відображають різноманітні шляхи нейронного ушкодження при інсультах головного мозку [139]. Для виявлення цих клітин здійснювали техніку забарвлення *Argyrophil III*. Отже темні нейрони характеризувалися аргірофільністю. Щоб викликати пошкодження, у CA1-зону гіпокампа щурів унілатерально вводили іботенову кислоту. Одним з завдань авторів було з'ясувати, чи є

аргірофільний стан нейронів незворотним у всіх випадках. Типові темні нейрони із пошкодженим цитоскелетом гинули, тоді як нетипові «коричневі» (*brown neurons*) із порушеннями в мітохондріях виживали. Найчастіше темні нейрони знаходили у СА1-зоні. Ультраструктурні зміни мічених аргірофільних нейронів було визначено за допомогою електронної мікроскопії. Csordas et al вважають, що доля темних нейронів залежить від присутності чи відсутності наступних патофізіологічних факторів у їх оточенні [112].

Ми порівнювали кількість пірамідних нейронів СА1-зони гіпокампа, які характеризувалися більшим проникненням метиленового синього, у контролі та після повторюваної легкої ЧМТ на день 5 від першого удару і встановили зростання її середнього значення після травми приблизно у 9 разів. Таким чином, повторювана легка ЧМТ у мишей супроводжувалася нейронним пошкодженням. Однак імуногістохімічний аналіз не виявив кількісних змін нейронів. За результатами електронномікроскопічного аналізу, після травми у пірамідному шарі гіпокампальної СА1-зони з'являлись нейрони, структура яких була більш ущільненою, ніж у більшості клітин тієї ж ділянки контрольних мишей.

Gallyas et al вивчали механізм утворення темних нейронів [140]. На їх думку, поява зморщених і базофільних (темних) клітин пояснюється ущільненням всіх їх ультраструктурних елементів після ураження. Автори наводять такий перелік характеристик темних клітин:

- 1) гіпербазофілія цитоплазми;
- 2) ядерний пікноз (незворотна конденсація хроматину);
- 3) зморщування всієї клітини;
- 4) підвищена електронна щільність;
- 5) компактизація ультраструктурних елементів;
- 6) агрегація ядерного хроматину за неапоптотичним сценарієм.

Таким чином, темні нейрони, виявлені нами за допомогою гістологічного забарвлення та світлової мікроскопії могли мати однакове походження з такими, що мали ущільнену структуру в електронномікроскопічних зразках.

4.3.2. Астро- та мікрогліоз у CA1-зоні гіпокампа мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми

Після нанесення повторюваної легкої ЧМТ ми здійснювали якісний і кількісний аналіз гліальних змін у CA1-зоні гіпокампа мишей, виявивши такі ознаки запальних процесів, як астро- та мікрогліоз.

Астроцити і клітини мікроглії відіграють змішану роль у пошкодженні головного мозку, одночасно сприяючи та перешкоджаючи регенерації нервової тканини залежно від специфічних умов [49]. Наприклад, реактивні астроцити виробляють молекули позаклітинного матриксу, які утворюють гліальний рубець і таким чином обмежують регенерацію аксонів. З іншого боку, так астроглія ізолює місце пошкодження і зупиняє його розширення. Більше того, астроцити виділяють трофічні фактори, необхідні для виживання нейронів.

Мікроглія також виробляє нейропротективні фактори, крім цього видаляючи залишки мертві залишки клітин та оркеструючи процеси відновлення у пошкодженому мозку [141]. Однак вплив мікроглії, що вийшла з-під контролю, може бути руйнівним щодо нейронів з-за інтенсивного виділення прозапальних і цитотоксичних медіаторів [142].

Астро- і мікрогліоз є відповідями головного мозку на розвиток патології і представлені морфологічними і кількісними змінами астроцитів і клітин мікроглії.

Kane et al навели дані про те, що повторювана легка ЧМТ призводила до підвищеної експресії GFAP, тобто активації астроцитів, але мікроглія залишалась неактивованою. За нашими результатами, відбувалась активація обох типів клітин. Хоча середня кількість клітин мікроглії на день 30 зменшилася, цей показник був значно вищим за такий у контролі.

Shandra et al встановили, що у мишей із повторюваною дифузною легкою ЧМТ відбувався непрофеліративний астрогліоз, тобто кількість астроцитів у головному мозку не зростала, але клітини потовщувались [68]. Крім цього, автори здійснили комплексний аналіз білків, які експресують астроцити різних типів, і прийшли до висновку про наявність нетипових клітин (*atypical astrocytes*). Варто відмітити, що останні не характеризувались підвищеною GFAP-експресією. Експериментальні тварини, у яких спостерігали напади пост-травматичної епілепсії, мали більшу площу нетипових астроцитів, ніж такі, у яких напади не траплялись. Ймовірно ці клітини беруть участь в епілептогенезі внаслідок дифузної ЧМТ. Мікрогліальні зміни після травми дослідники визначили, як помірні.

Mouzon et al порівнювали поведінкові та гістологічні наслідки поодинокі та повторюваної легкої фокальної ЧМТ у мишей [143]. У другій групі експериментальних тварин травму наносили за моделлю контрольованого кіркового пошкодження 5 разів з інтервалом 48 год. За результатами гістологічного та імуногістохімічного аналізу, ЧМТ не супроводжувалася втратою нейронів, однак були наявні ознаки гліозу, особливо при повторних механічних пошкодженнях і в CA1-зоні гіпокампа. Автори вивчали морфологічні зміни у стовбурі, корі, мозолистому тілі та гіпокампі.

Таким чином, у ряді досліджень при повторюваній легкій ЧМТ спостерігали розвиток гліозу, при чому його характеристики відрізнялися.

На нашу думку, це може пояснюватися відмінностями у параметрах нанесення механічного пошкодження, а також особливостями експериментальних тварин у кожному дослідженні.

Отримані нами дані щодо морфологічних наслідків повторюваної легкої ЧМТ зугоджуються із описаними раніше. Є цікавими більш специфічні характеристики гліозу, наприклад, такі що пов'язані з експресією окремих білків астроцитів і мікроглії.

4.4. Нейропротективний ефект корвітину при повторюваній легкій черепно-мозковій травмі у мишей

Після повторюваної легкої ЧМТ мишам здійснювали ін'єкції корвітину, який є водорозчинним комплексом біофлавоноїду кверцетину та полівінілпіролідону. Препарат було розроблено в Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця. Ефекти корвітину досліджували в експериментальних моделях гострого ушкодження легень [145], серцевої недостатності [145, 146], атеросклерозу [147], ішемії головного мозку [102] тощо. Нами вперше описано морфофункціональні наслідки введення корвітину після повторюваної легкої ЧМТ. Зокрема ми спостерігали послаблення астро- та мікрогліозу, отже, препарат виявив нейропротективну дію.

Відомо, що у тривалій перспективі повторювана легка ЧМТ підвищує ризик розвитку таких нейродегенеративних патологій, як хронічна травматична енцефалопатія, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона та ін. [37, 44, 148]. Прояви вторинного пошкодження в першу чергу пов'язані з цитотоксичними та запальними процесами, що призводять до метаболічних порушень гомеостазу головного мозку з-за недостатності кровопостачання [42, 100, 149, 150]. Оксидативний стрес як

наслідок механічної травми головного мозку є потужним фактором ураження, що в свою чергу призводить до порушення мозкового кровотоку. При ЧМТ відбувається вивільнення та активація вільних радикалів.

Природні флавоноїди володіють потужною антиоксидантною дією, і кверцетин є найбільш дослідженим з них [92, 95–101].

4.4.1. Механізм дії кверцетину при порушеннях центральної нервової системи

Антиоксидантну дію кверцетину пояснюють наявністю кількох гідроксильних груп, які сполучаються з вільними радикалами, сприяючи виживанню клітин [151]. Серед численних властивостей фенолів, до яких належить кверцетин, особливо виділяється здатність до пригнічення ліпопероксидазного ушкодження [152]. Останній процес каталізується накопиченням продуктів дезінтеграції гемоглобіну та вивільненням іонів заліза при вторинному пошкодженні, яке супроводжує механічні травми ЦНС [153, 154].

Schultke et al застосовували кверцетин при ЧМТ та спинномозковій травмі у щурів [99–101, 155]. Для відтворення дифузної ЧМТ автори вибрали рідинно-перкусійне пошкодження, яке відповідало помірному рівню тяжкості (*moderate*) [99]. Вибір кверцетину було обґрунтовано наступними його властивостями:

- 1) безпосередньо знижує оксидативний стрес, усуваючи оксиданти та запускаючи білки фази 2, а також зв'язує йони Fe^{2+} , перешкоджаючи таким чином залізо-опосередкованій пероксидації ліпідів;
- 2) послаблює оксидативне пошкодження, гальмуючи активність мієлопероксидази та ксантинооксидази;

- 3) пригнічує сигнальні шляхи кіназ, які призводять до запалення та/або апоптозу;
- 4) пригнічує активацію нейтрофілів.

Для встановлення можливого механізму нейропротективної дії кверцетину при ЧМТ Schultke et al вивчали електрофізіологічні параметри, переконавшись у попередніх дослідженнях, що вони є індикатором аксонної цілісності, а також вимірювали активність мієлопероксидази та рівень глутатіону. Дослідники визначили, що введення кверцетину перешкодило зниженню рівня глутатіону і призвело до зменшення активності мієлопероксидази. За результатами вимірювання електрофізіологічних параметрів (у даному дослідженні – *compound action potential amplitudes*) у зрізах мозолистого тіла, після ін'єкцій флавоноїду також відбувалося покращення, порівняно із показниками травмованих тварин, яким не вводили препарат.

Кверцетин також було застосовано після відтворення спинномозкової травми у щурів [101]. Автори, спираючись на дані попередніх досліджень, використали як індикатор тяжкості пошкодження ЦНС рівень білка S-100 β . Раніше було показано, що дана сполука захищає моторні нейрони і сприяє їх відновленню у периферичній нервовій системі щурів [156, 157]. Дослідники встановили, що введення кверцетину травмованим щурам супроводжується зростанням концентрації цього білка [101]. Отже, кверцетин зменшує ступінь ураження ЦНС. Крім цього, результати цього дослідження вказують на зв'язок введення кверцетину і реакції глії, оскільки білок S-100 β експресується астроцитами та олігодендроцитами. Також Schultke et al показали, що ін'єкції даного біофлавоноїду щурам після спинномозкової травми сприяли відновленню у них моторної функції [155], тоді як травмовані тварини, яким вводили фізіологічний розчин не були здатні пересуватися.

4.4.2. Поведінкові характеристики мишей після введення корвітину у моделі повторюваної легкої черепно-мозкової травми

Після введення корвітину травмованим мишам ми проводили поведінкові тести у «Відкритому полі» та Т-лабіринті. Показники локомоторної активності зросли, порівняно із такими після травми без введення препарату, і наблизились до рівня контрольних значень, однак відмінності не були статистично значущими. Інтенсивність грумінгу дещо впала, а кількість актів дефекації помітно зросла навіть у порівнянні з контролем. У Т-лабіринті спостерігалось підвищення відносної кількості альтернативних виборів, що могло б свідчити про відновлення здатності до дослідження нового простору, а також зниження рівня тривожності. У всіх випадках зміни не були достовірними.

У попередніх дослідженнях ефективність кверцетину щодо відновлення поведінкових характеристик після механічного пошкодження було доведено при відтворенні спинномозкової травми [155]. Щури піддавались ламінектомії і компресійному пошкодженню грудного відділу спинного мозку. Для оцінки моторної функції в експериментальних тварин вчені використовували 21-бальну шкалу ВВВ (*Basso, Beattie, Bresnahan*) [158], де значення «0» відповідало повній знерухомленості, а «21» – здоровій тварині, яка здатна самотійно пересуватись. Моторну функцію порівнювали у травмованих щурів, яким вводили фізіологічний розчин, і травмованих щурів, яким здійснювали ін'єкції різних доз кверцетину (5, 25, 50 і 100 $\mu\text{моль/кг}$). Між групами із різними дозами кверцетину значущих відмінностей знайдено не було, однак статистично достовірні зміни спостерігали у порівнянні зі значеннями групи, якій вводили фізіологічний розчин. Зростання значення шкали ВВВ після ін'єкцій кверцетину згоджувалося із даними, які свідчили про поліпшення кліренсу йонів заліза. Автори вважають, що одним з механізмів

послаблення вторинного пошкодження та відновлення моторної функції у щурів зі спинномозковою травмою може бути хелація заліза.

Yang et al досліджували антиапоптотичний і антиоксидантний ефекти кверцетину у моделі ЧМТ за Фіні (рис. 1.2) [159]. Щури отримували локальну травму у ділянці лівого гіпокампа. Для оцінки поведінкових параметрів автори проводили тестування у водному лабіринті Морріса. Даний тест є класичним для визначення когнітивної функції експериментальних тварин [160]. Порівняно з контрольними значеннями, параметри у водному лабіринті Морріса виявилися значно нижчими у травмованих тварин, яким вводили фізіологічний розчин або кверцетин, проте приблизно через місяць після травми результат у щурів, які отримували ін'єкції кверцетину, значно покращився [159]. Отже, введення кверцетину супроводжувалося зменшенням когнітивного дефіциту, разом з цим спостерігали гальмування оксидативного стресу та запальних процесів, а також загибелі нейронів. Це проявлялося у зниженні концентрації ряду речовин, які беруть участь у запаленні та апоптозі, тоді як рівень антиоксидантних ферментів підвищувався. Таким чином покращення когнітивної функції зугоджувалось з антиоксидантним ефектом кверцетину.

Du et al вивчали вплив кверцетину при ЧМТ за методикою вільного падіння вантажу [161]. Показники поведінкових параметрів визначали за шкалою NSS [42, 118]. Введення кверцетину призводило до помітного покращення моторної функції, порівняно із травмованими щурами, які не отримували препарат. Крім цього, зросли показники щодо виживання нейронів у корі головного мозку і знизилися такі, які відповідають апоптотичним процесам. Також морфологічні зміни головного мозку проявлялися у зменшенні ступеня набряку.

Ряд наукових джерел свідчить про ефективність кверцетину у відновленні поведінкових характеристик після ЧМТ, включаючи

показники моторної та когнітивної функцій, що підтверджується морфологічними даними. У нашому дослідженні спостерігалася тенденція до відновлення локомоторної активності після введення корвітину, однак для встановлення достовірних поведінкових ефектів препарату у моделі повторюваної легкої ЧМТ необхідні подальші дослідження.

4.4.3. Гальмування астро- та мікрогліозу у CA1-зоні гіпокампа мишей після введення корвітину у моделі повторюваної легкої черепно-мозкової травми

У нашому дослідженні було показано, що астро- та мікрогліоз, які почали розвиватися після повторюваної легкої ЧМТ, стали значно менш інтенсивними під впливом корвітину. Причому середня кількість і астроцитів, і клітин мікроглії через місяць від початку лікування знаходилася на рівні контрольних значень. Однак гіпертрофія клітин глії свідчила про те, що запалення не було усунено остаточно.

Астроцити та клітини глії вважаються одними з ключових учасників запальних процесів у ЦНС, які у випадку ЧМТ є складовою вторинного пошкодження. Наприклад, астроцити створюють функціональний бар'єр у вигляді рубців, який обмежує подальше поширення запалення [162]. Крім цього, вони здатні виявляти прозапальний потенціал, виробляючи сполуки, які скеровують роботу різноманітних лейкоцитів. Мікроглія має і нейропротективні, і нейрозапальні властивості залежно від сигналів мікросередовища [163]. Відомо, що при розсіяному склерозі вона набуває статусу такої, яка асоційована із захворюванням (*disease-associated microglia*). При експериментальному аутоімунному енцефаліті, моделі розсіяного склерозу, такі клітини мають виражений запальний фенотип. Подібним чином астроцити, реагуючи на сигнали мікросередовища,

виконують захисну функцію або встають на шлях пошкодження [164]. Наприклад, такі сполуки, як TGF β , IFN γ , gp130, естроген, STAT3, BDNF і FasL, підтримують захисний фенотип астроцитів, тоді як IL17, сфінголіпіди, TrkB, SOCS3, NF κ B, хемокіни та VEGF спрямовують їх до посилення руйнівних процесів у нервовій системі.

Ефекти кверцетину досліджували за різноманітних патологій нервової системи: ішемії головного мозку, механічних пошкодженнях спинного і головного мозку тощо [99-102, 155-157]. Відома його антиоксидантна, антиапоптотична та протизапальна дія. Зокрема Khan et al показали, що введення кверцетину при запаленні, запущеним ін'єкцією ліпополісахариду, призводить до послаблення гліальних реакцій [165]. Ліпополісахарид є невід'ємною складовою грам-негативних бактеріальних клітинних стінок, яка здатна стимулювати нейрозапалення, що у свою чергу запускає нейродегенерацію. Отже метою авторів було визначити нейропротективний потенціал кверцетину при нейродегенеративних процесах і дисфункції пам'яті у дорослих мишей. Ін'єкції ліпополісахариду викликали гліальну активацію, що призводило до вивільнення хемокінів, цитокінів та інших медіаторів запалення і наступної активації мітохондріального апоптотичного шляху та нейронної дегенерації. Під впливом ліпополісахариду щільність астроцитів і клітин мікроглії у корі та гіпокампі зростала приблизно удвічі, порівняно з контролем, і після введення кверцетину наближалась до початкових значень. Імуногістохімічні дані щодо GFAP- та Iba1-експресії підтверджувалися результатами вестерн-блот аналізу. Крім цього, ефект кверцетину полягав у наближенні щільності нейронів до контрольних значень – як в корі головного мозку, так і в гіпокампі. Дослідники пояснили зниження загибелі нейронів регуляцією білків BAX і Bcl2, зниженням активованого цитохрому c, активності каспази-3 і кліренсу PARP-1 у кіркових і гіпокампальних ділянках головного мозку мишей.

Зміни рівня GFAP-експресії та металотіонеїну у ЦНС (гіпокампі, мозочку, таламусі та неокортексі) щурів вивчали після пошкодження, викликаного ін'єкцією пітуїтрину-ізадрину, та наступного введення кверцетину у складі корвітину [146]. Поєднання пітуїтрину та ізадрину характеризується такими ефектами, як зниження кровотоку та обмеження доступу кисню та глюкози для тканин. У головному мозку щурів під впливом пітуїтрину-ізадрину рівень металотіонеїну знижувався, а GFAP – навпаки підвищувався. Відбувався астрогліоз. Крім цього, у щурів спостерігали дисфункцію міокарду. Металотіонеїн – білок, який експресується реактивними астроцитами [166]. Останні з'являються внаслідок молекулярних і морфологічних змін під впливом ушкодження ЦНС. За даними Leung et al, *in vitro* присутність металотіонеїну спричиняла астрогліоз, який сприяв відновленню нейронів. Раніше було показано, що вироблення астроцитами МТ-I/-II, білка одного з класів металотіонеїну, є специфічною реакцією на нейронне пошкодження і стимулює регенеративні процеси [167]. Отже після введення корвітину за ушкодження, викликаним ін'єкцією пітуїтрину-ізадрину, спостерігали відновлення балансу щодо експресії GFAP та металотіонеїну [146]. Автори навели думку про те, що останній білок здатний до усунення вільних радикалів при оксидативному стресі, яким супроводжується пошкодження головного мозку. Таким чином корвітин посилив власні ресурси нервової системи щурів, стимулювавши відновлення рівня металотіонеїну. Також відбувалося повернення поведінкових параметрів до рівня контрольних значень у «Відкритому полі», зокрема локомоторної активності.

Нейропротективний вплив кверцетину у щурів зі спинномозковою травмою проявлявся в пригніченні клітин мікроглії, які набули фенотипу M1, та гальмуванні загибелі олігодендроцитів, отже і демієлінізації [168]. M1 – це фенотип клітин мікроглії, наявність якого перешкоджає процесам регенерації у нервовій системі, тоді як фенотип M2 характеризується

протилежним впливом і стимулює відновлення структури тканин [169, 170]. Введення кверцетину призвело до покращення функціонального стану травмованих експериментальних тварин, разом з цим гальмувалася втрата мієліну та аксонів [168]. Автори обґрунтували дане явище пригніченням шляхів STAT1 і NF-κB, які пов'язані із руйнівним фенотипом мікроглії.

Мікроглія, яка є учасником запальних процесів у тканинах головного мозку, виробляє фактори, що активують цитокіни [171]. Виходячи з-під контролю, активність мікроглії зумовлює тривалі нейротоксичні процеси, які супроводжуються апоптозом нейронів і нейродегенерацією [172]. Kom et al вивчали ефекти кверцетину за оксидативного стресу, поведінкових і гістологічних порушень після ЧМТ за методикою вільного падіння вантажу у мишей [171]. Автори встановили такі відхилення при механічному пошкодженні головного мозку, як зміни у координації рухів, зростання рівня пероксидації ліпідів, а також падіння активності антиоксидантних ферментів – супероксид дисмутази, каталази та глутатіон пероксидази. Морфологічними наслідками травми були зміни структури нейронів і їх щільності та зменшення кількості нейронних зв'язків у корі головного мозку. Після введення кверцетину поведінкові характеристики відновлювалися, рівень пероксидації ліпідів знижувався, а антиоксидантних ферментів зростав. Гістологічні дані також свідчили про нейропротективну дію кверцетину. Таким чином науковці дійшли висновку, що кверцетин має потенціал щодо послаблення оксидативного стресу, запущеного запальними процесами у нервових тканинах.

Дані численних експериментальних досліджень свідчать про нейропротективний потенціал кверцетину, механізм впливу якого полягає у пригніченні запальних процесів, спричинених вторинним пошкодженням при механічній травмі та багатьох інших патологіях. Зокрема дана сполука знижує інтенсивність пероксидації ліпідів, яка призводить до руйнування

клітинних мембран. Також показано, що введення кверцетину при патологіях нервової системи супроводжується гальмуванням гліальної активації. Ми вперше описали вплив кверцетину у комплексі з полівінілпіролідом на структуру СА1-зони гіпокампа при повторюваній легкій ЧМТ. Процеси астро- та мікрогліозу, які були наслідком механічного пошкодження, значно слабшали після ін'єкцій корвітину. Дані спостереження зугоджуються з результатами досліджень щодо впливу кверцетину на нервові тканини при інших патологіях.

На відміну від кверцетину, корвітин є водорозчинним препаратом, а отже більш доступним для тканин головного мозку.

У нашому дослідженні корвітин виявив виражений нейропротективний потенціал, однак астроцити та клітини мікроглії після його введення залишалися в активованому стані, а поведінкові параметри не характеризувалися достовірними змінами, отже є необхідними подальше вивчення властивостей даного препарату, зокрема більш детальних механізмів його впливу, а також пошук ефективних схем введення корвітину для максимальної реалізації його протизапального, антиоксидантного і нейропротективного потенціалу при повторюваній легкій ЧМТ.

4.5. Перспективи діагностики легкої черепно-мозкової травми

Наразі діагностика легкої ЧМТ ускладнюється недостатньою чутливістю до її наслідків таких загальноприйнятих методів, як магнітно-резонансна томографія, комп'ютерна томографія, електроенцефалографія тощо. Накопичується все більше експериментальних даних про морфологічні зміни головного мозку при легкій ЧМТ, однак прижиттєві методи діагностики, які б відображали дані процеси на тканинному,

клітинному та молекулярному рівні залишаються на стадії розробки. До таких методів належать виявлення ознак легкої ЧМТ за біомаркерами крові та спинномозкової рідини [173-175], мічення сполук, пов'язаних із нейродегенеративними процесами у позитронно-емісійній томографії [11, 143, 175] та дифузійна тензорна томографія [59, 143, 176], яка дозволяє відслідкувати пошкодження аксонів.

4.5.1. Біомаркери крові та спинномозкової рідини

За епідеміологічними даними останніх двох десятиліть, легка ЧМТ, особливо її повторювані випадки, є фактором ризику щодо розвитку нейродегенеративних захворювань [4–6, 10, 11]. Актуальним є своєчасне виявлення чутливості до подібних наслідків у людини [47]. Біомаркери нейронного, аксонного та астрогліального ушкодження могли б бути використані для діагностики легкої ЧМТ і прогнозування клінічних результатів. Розглядали наступні потенційні індикатори морфологічних змін при даному різновиді травми:

- 1) співвідношення альбуміну у спинномозковій рідині та сироватці;
- 2) інтерлейкіни та інші білки, пов'язані із гострою фазою запалення;
- 3) τ -білок;
- 4) MBP (*myelin basic protein* – основний мієліновий білок);
- 5) тонкий і важкий поліпептидні нейрофіламенти;
- 6) γ -енолаза;
- 7) S100- β ;
- 8) GFAP;
- 9) попередники β -амілоїду (APP) та β -амілоїд;
- 10) продукти розпаду спектри ну;
- 11) UCHL1 (*ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoenzyme L1*);

- 12) малі некодуєчі РНК-молекули у мононуклеарних клітинах периферичної крові.

Коливання рівня наведених вище сполук при пошкодженнях ЦНС було описано в експериментальних дослідженнях, однак проблемою виявилася нестача прижиттєвих методів, які б дозволили виявити дані зміни у людини. Наприклад, перспективними біомаркерами легкої ЧМТ вважаються GFAP та S100-β, експресія у нервових тканинах яких змінюється під впливом механічного пошкодження головного мозку і зугоджується із розвитком астрогліозу, яким супроводжувалася повторювана легка ЧМТ і у нашому дослідженні.

У пошуці ефективних біомаркерів легкої ЧМТ Shahim et al зосередили свою увагу на аксонному тонкому білковому нейрофіламенті (*axonal protein neurofilament light*) в сироватці крові [177]. Вміст даного білка є особливо високим у ЦНС. У першу чергу він експресується довгими мієлінізованими підкірковими аксонами [47]. Попередньо було показано, що його концентрація у спинномозковій рідині боксерів після бою корелювала із тяжкістю пошкодження головного мозку [178, 179].

Shahim et al вимірювали вміст аксонного тонкого білкового нейрофіламенту у сироватці крові за допомогою ультраточливої технології *single molecule array* [177]. Було проведено два окремих дослідження. У першому порівнювали значення концентрації сполуки у боксерів-аматорів через 7-10 днів після бою і таких після трьох місяців відпочинку, а у другому брали участь професійні хокеїсти через 1, 12, 36 та 144 год після струсу головного мозку і спортсмени, що повернулися до гри. Контрольними групами слугували здорові спортсмени та неспортсмени. Концентрація нейрофіламенту в сироватці боксерів через 7-10 днів після бою зросла, порівняно із такою після трьох місяців відпочинку, однак остання була вищою за контрольні значення. Результати боксерів, які піддавались більше, ніж 15-ти ударам, характеризувалися вищими

показниками, ніж такі, що отримували менше ударів. У хокеїстів концентрація нейрофіламента так само зростала із часом і поверталася до норми, коли спортсмени знову починали брати участь у грі. Виявилося, що за значеннями концентрації аксонного тонкого білкового нейрофіламента можливо розділити гравців із наслідками струсу, які стрімко зникають, та спортсменів зі стійкими симптомами.

Наразі рідкі біомаркери аксонного пошкодження та астрогліальної активації вважаються найперспективнішими кандидатами щодо діагностики легкої ЧМТ [180].

4.5.2. τ -білок як біомаркер легкої черепно-мозкової травми та позитронно-емісійна томографія

Проблема наслідків легкої ЧМТ почала привертати до себе увагу з-за зростання кількості даних щодо морфологічних змін у головному мозку загиблих спортсменів із повторними випадками струсу в історії хвороби [4–6, 8, 10, 11, 21, 23]. Стало очевидним, що розвиток патофізіологічних процесів після легкої травми можливий навіть тоді, коли при діагностиці із використанням загальноприйнятих методів не спостерігають жодних структурних відхилень. Одним з посмертних гістологічних маркерів таких порушень виявилися накопичення гіперфосфорильованого τ -білка [24, 55], які у вигляді нейрофібрилярних сплетень є типовими, наприклад, для хвороби Альцгеймера [181]. Беннет Омалу був одним з перших, хто описав у загиблих гравців Національної футбольної ліги ознаки хронічної травматичної енцефалопатії – нейродегенеративного захворювання, асоційованого з випадками ЧМТ [182]. Його опис результатів аутопсії виглядав наступним чином. Пацієнт мав симптоми порушення когнітивної функції, розлади настрою та паркінсонічні симптоми. Його смерть сталася

внаслідок захворювання коронарних артерій. У головному мозку не було помічено жодних ознак кіркової атрофії, контузії, крововиливу або інсульту. Однак у корі знаходилися велика кількість амілоїдних бляшок та розсіяні нейрофібрилярні сплетення разом з τ -позитивними невритними нитками. Спостереження Беннета Омалу стали істотною підставою для дослідження можливих пізніх нейродегенеративних наслідків у спортсменів, що неодноразово піддавались легкій ЧМТ.

Kane et al, які розробили експериментальну модель повторюваної ЧМТ, вимірювали рівень білка фосфо-тау при даному виді механічного пошкодження і отримали дані про його зростання, порівняно з контролем [85], що могло бути ранньою ознакою розвитку нейродегенеративних процесів. Про участь τ -білка у патогенезі повторюваної легкої ЧМТ свідчили результати і інших експериментальних досліджень [16, 120, 183].

Turner et al наводять позитронно-емісійну томографію як метод, який робить можливим відслідковування накопичення τ -білка [57]. Принцип роботи цього методу полягає у введенні в організм радіоактивного препарату, який слугує хімічною міткою [184]. Останній концентрується в ділянках організму з найбільшою метаболічною активністю. Таким чином після введення специфічного для τ -білка радіоліганда можна візуалізувати його накопичення при вивченні наслідків легкої ЧМТ [185]. Раніше позитронно-емісійну томографію застосовували здебільшого при тяжких формах ЧМТ, але з'явилися дані, які свідчать про її потенціал у діагностиці і легкої травми [186, 187].

На думку науковців, подібна чутливість є сильним боком позитронно-емісійної томографії, однак недолік цього підходу полягає в обмеженні кількості сканувань з-за радіоактивності ізотопів, які слугують мітками [57].

4.5.3. Дифузійна тензорна томографія

У нашому дослідженні повторювана легка ЧМТ супроводжувалася запальними процесами, проявами яких був розвиток астро- та мікрогліозу. Однією з перших подій ЧМТ, які викликають запалення, вважають розтягнення аксонів і наступне вивільнення запальних речовин [188, 189].

Поширеним наслідком механічної травми голови є дифузне аксонне пошкодження, зумовлене прискоренням та гальмуванням головного мозку всередині черепа [34]. Дифузне аксонне пошкодження у свою чергу викликає каскад біохімічних процесів, які супроводжуються загибеллю нейронних, гліальних і ендотеліальних клітин, а також дегенерацією білої речовини [42]. Цікаво, що, за даними деяких авторів, навіть клінічно діагностована легка ЧМТ необов'язково характеризується дифузним аксонним пошкодженням [190].

Дифузійна тензорна томографія – різновид магнітно-резонансної томографії, який має потенціал щодо визначення цілісності аксонів і білої речовини через вимірювання напрямку та анізотропії дифузії води вздовж аксонів нервових волокон [57, 191-193]. У експериментальних моделях показано, що його результати корелюють зі станом організму через тривалі проміжки часу [194]. Asken et al здійснили систематичний аналіз клінічних та експериментальних даних за останні два десятиліття щодо параметрів дифузійної тензорної томографії при легкій ЧМТ [195]. На їх думку, даний метод володіє високою чутливістю, однак наразі є недостатньо специфічним, оскільки результати при легкій ЧМТ перекривалися із такими при великому депресивному розладі та синдромі порушення активності та уваги. Отже, дифузна тензорна томографія є перспективним засобом діагностики легкої ЧМТ за умови подальших тривалих досліджень для підвищення її специфічності та стандартизації.

Вивчення патофізіології повторюваної легкої ЧМТ залишається надзвичайно актуальним, оскільки її наслідки виявилися такими, що мають накопичувальний характер і можуть проявитися лише через великі проміжки часу. Незважаючи на «прихованість» останніх, посмертні гістологічні та експериментальні дані свідчать про морфологічні зміни головного мозку внаслідок легкої навіть у короткотривалій перспективі. Наприклад, нами було показано, що процеси астро- та мікрогліозу починають розвиватися одразу після відтворення повторюваної легкої ЧМТ, до того ж, їх інтенсивність продовжувала зростати протягом місяця. Крім цього, збільшувалася кількість темних нейронів, які ймовірно стали на шлях загибелі. Морфологічні зміни астроцитів і клітин мікроглії поєднувалися із пригніченням локомоторної активності в поведінкових тестах. Отже, виявилася очевидною необхідність у більш детальному вивченні наслідків повторюваної легкої ЧМТ та пошуку засобів її лікування. Корвітин, який є комплексом біофлавоноїду кверцетину та полівінілпіролідону, продемонстрував виражену нейропротективну дію через гальмування процесів гліому.

Надалі експериментальні дослідження необхідні для глибшого розуміння механізмів вторинного пошкодження при повторюваній легкій ЧМТ, зокрема деталізації подій оксидативного стресу та запалення. Експериментальні дані щодо даного виду травми мають безумовну цінність для розробки її потенційних біомаркерів, а також ефективних засобів лікування та профілактики її наслідків у клінічних умовах.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі в умовах експериментів на мишах досліджено морфологічні наслідки повторюваної легкої ЧМТ (астро- та мікрогліоз, зміна характеристик нейронів у CA1-зоні гіпокампа), а також зміни поведінкових феноменів у відповідних тестах. Вперше показано можливий шлях корекції морфофункціональних змін у головному мозку мишей після повторюваної легкої ЧМТ корвітином. Таким чином, цей препарат можна вважати потенційним засобом для усунення наслідків даного різновиду травми та попередження подальшого розвитку нейродегенеративних порушень.

1. Порівняння відносного вмісту рідини у головному мозку мишей свідчить, що у групі, підданій повторюваній легкій ЧМТ, набряк головного мозку практично не розвивався. Електронномікроскопічний аналіз також не виявив ознак набряку після вказаних впливів.
2. За результатами поведінкового тесту «Відкрите поле», у мишей в день останньої травматизації спостерігалось достовірне зростання кількості актів дефекації. Також у той самий день спостерігається достовірне збільшення кількості часу, необхідного травмованим тваринам для відпочинку. У «Т-лабіринті» не спостерігалось достовірних змін активності мишей, орієнтованої на дослідження нового простору після повторюваної легкої ЧМТ.
3. Аналіз гістологічних і електронномікроскопічних змін у тканині гіпокампа показав збільшення кількості «темних» та електроннощільних нейронів. Середня кількість «темних» нейронів у тест-зоні 0.09 мм^2 у травмованих мишей (5.17 ± 1.24) була майже на порядок вищою, ніж така у контрольних (0.57 ± 0.25 , $P < 0.05$).

4. Після вказаної ЧМТ у гіпокампі мишей спостерігалася істотна активація астроцитів та мікрогліальних клітин. Кількість GFAP-позитивних астроцитів значно зростала на 5-ий, 10-ий та 30-ий день від першої травми у порівнянні з контролем. Оцінка мікрогліальної реакції при повторюваній легкій ЧМТ виявила, що середня кількість Iba1-позитивних клітин порівняно з контролем достовірно зростала. Отже, повторювана легка ЧМТ супроводжується процесами астро- та мікрогліозу.
5. Інтраперитонеальне введення корвітину призводить до істотного, але неповного наближення поведінкових показників у експериментальних тварин до контрольних значень.
6. Після введення корвітину у травмованих мишей спостерігалось достовірне зменшення кількості активованих астроцитів і клітин мікроглії. На 30-ий день кількість астроцитів і клітин мікроглії наближалась до контрольних значень. Отже, корвітин гальмує розвиток реактивного гліозу у CA1-зоні гіпокампа після відтворення травми та демонструє виражену нейропротективну дію.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Basic Information about Traumatic Brain Injury and Concussion [Internet]. 2016 Jan 22 [cited 2019 Dec 17]. Available from: <http://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/basics.html>.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Injury Prevention and Control. Report to Congress on mild traumatic brain injury in the United States: steps to prevent a serious public health problem. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 2003.
3. Traumatic Brain Injury [Internet]. 2019 Mar 29 [cited 2019 Dec 17]. Available from: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/traumatic-brain-injury/basics/causes/con-20029302>.
4. Guskiewicz KM, Marshall SW, Bailes J, McCrea M, Cantu RC, Randolph C, Jordan BD. Association between recurrent concussion and late-life cognitive impairment in retired professional football players. *Neurosurgery*. 2005;57(4):719–26.
5. Milman A, Rosenberg A, Weizman R, Pick CG. Mild Traumatic Brain Injury Induces Persistent Cognitive Deficits and Behavioral Disturbances in Mice. *J Neurotrauma*. 2005;22(9) 22:1003–10.
6. McKee AC, Stein TD, Nowinski CJ, Stern RA, Daneshvar DH, Alvarez VE et al The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy. *Brain*. 2013;136(Pt 1):43–64.
7. Guskiewicz KM, Bruce SL, Cantu RC, Michael S, Kelly JP, Mccrea M et al National Athletic Trainers' Association Position Statement: Management of Sport- Related Concussion. *J Athl Train*. 2004;39(3):280–97.
8. McKee AC, Robinson ME. Military-related traumatic brain injury and neurodegeneration. *Alzheimers Dement*. 2014;10(3 Suppl):S242-53.

9. McKee AC, Daneshvar DH, Alvarez VE, Stein TD. The neuropathology of sport. *Acta Neuropathol.* 2014;127(1):29–51.
10. Lucke-Wold BP, Turner RC, Logsdon AF, Bailes JE, Huber JD, Rosen CL. Linking traumatic brain injury to chronic traumatic encephalopathy: identification of potential mechanisms leading to neurofibrillary tangle development. *J Neurotrauma.* 2014;31:1129–38.
11. Davis GA, Iverson GL, Guskiewicz KM, Ptito A, Johnston KM. Contributions of neuroimaging, balance testing, electrophysiology and blood markers to the assessment of sport-related concussion. *Br J Sports Med.* 2009;43(1 Suppl):i36-45.
12. Hicks R, Soares H, Smith D, McIntosh T. Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neuropathol.* 1996;91(3):236–46.
13. LaPlaca MC, Simon CM, Prado GR, Cullen DK. CNS injury biomechanics and experimental models. *Prog Brain Res.* 2007;161:13–26.
14. Webster SJ, Van Eldik LJ, Watterson DM, Bachstetter AD. Closed Head Injury in an Age-Related Alzheimer Mouse Model Leads to an Altered Neuroinflammatory Response and Persistent Cognitive Impairment. *J Neurosci.* 2015;35(16):6554–69.
15. Kunihiro U, Laurer H, McIntosh T, Pratico D, Martinez D, Leight S et al. Repetitive Mild Brain Trauma Accelerates A β Deposition, Lipid Peroxidation, and Cognitive Impairment in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Amyloidosis. *J Neurosci.* 2002;22(2):446–54.
16. Ojo JO, Mouzon B, Greenberg MB, Bachmeier C, Mullan M, Crawford F. Repetitive mild traumatic brain injury augments tau pathology and glial activation in aged hTau mice. *J Neuropath Exp Neur.* 2013;72(2):137–51.
17. Kamins J, Giza CC. Concussion-Mild TBI: Recoverable Injury with Potential for Serious Sequelea. *Neurosurg Clin N Am.* 2016;27(4):441–52.

18. McCrory P, Meeuwisse W, Johnston K, Dvorak J, Aubry M, Molloy M, Cantu R. Consensus statement on Concussion in Sport 3rd International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2008. *Clin J Sport Med.* 2009;19(3):185–200.
19. Belanger HG, Curtiss G, Demery JA, Lebowitz BK, Vanderploeg RD. Factors moderating neuropsychological outcomes following mild traumatic brain injury: A meta-analysis. *J Int Neuropsychol Soc.* 2005;11:215–27.
20. Lundin A, de Boussard C, Edman G, Borg J. Symptoms and disability until 3 months after mild TBI. *Brain Inj.* 2006;20(8):799–806.
21. Daneshvar DH, Riley DO, Nowinski CJ, McKee AC, Stern RA, Cantu RC. Long-term consequences: effects on normal development profile after concussion. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2011;22(4):683–700.
22. McKee AC, Daneshvar DH, Alvarez VE, Stein TD. The neuropathology of sport. *Acta Neuropathol.* 2014;127(1):29–51.
23. Stern RA, Riley DO, Daneshvar DH, Nowinski CJ, Cantu RC, McKee AC. Long-term Consequences of Repetitive Brain Trauma: Chronic Traumatic Encephalopathy. *PM R.* 2011;3:460–7.
24. McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE, et al Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009;68(7):709–35.
25. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.* 2004;84(2):361–84.
26. Gavett BE, Stern RA, McKee AC. Chronic Traumatic Encephalopathy: A Potential Late Effect of Sport-Related Concussive and Subconcussive Head Trauma. *Clin Sports Med.* 2011;30(1):179–88.
27. Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The Neuropathology and Neurobiology of Traumatic Brain Injury. *Neuron.* 2012;76(5):886–99.
28. Smith DH, Johnson VE, Stewart W. Chronic neuropathologies of single and repetitive TBI : substrates of dementia? *Nat Rev Neurol.* 2013;9:211–221.

29. Guskiewicz KM, Marshall SW, Bailes J, McCrea M, Cantu RC, Randolph C, Jordan BD. Association between recurrent concussion and late-life cognitive impairment in retired professional football players. *Neurosurgery*. 2005;57(4):719–26.
30. Gourley MM, Valovich McLeod TC, Bay RC. Awareness and Recognition of Concussion by Youth Athletes and Their Parents. *Athl Train Sport Heal Care*. 2010;2(5):208–18.
31. Kirschen MP, Tsou A, Nelson SB, Russell JA, Larriviere D, Kirschen MP, et al. Legal and ethical implications in the evaluation and management of sports-related concussion. *Neurol*. 2014;83(4):352–8.
32. Kutcher JS, McCrory P, Davis G, Pfitz A, Meeuwisse WH, Broglio SP. What evidence exists for new strategies or technologies in the diagnosis of sports concussion and assessment of recovery? *Br J Sports Med*. 2013;47(5):299–303.
33. Comper P, Bisschop SM, Carnide N, Tricco A. A systematic review of treatments for mild traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2005;19(11):863–80.
34. Meaney DF, Smith DH. Biomechanics of concussion. *Clin Sports Med*. 2011;30(1):19–31.
35. Zhang L, Bae J, Hardy WN, Monson KL, Manley GT, Goldsmith W, Yang KH, King AI. Computational study of the contribution of the vasculature on the dynamic response of the brain. *Stapp Car Crash J*. 2002;46:145–64.
36. Wallis RA, Panizzon KL, Girard JM. Traumatic neuroprotection with inhibitors of nitric oxide and ADP-ribosylation. *Brain Research*. 1996;710:169–77.
37. Granacher RPJ. *Traumatic Brain Injury*. 3rd ed. CRC Press; 2015.
38. Khatri N, Thakur M, Pareek V, Kumar S, Sharma S, Datusalia AK. Oxidative Stress: Major Threat in Traumatic Brain Injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2018;17(9):689-95.

39. Клиническое руководство по черепно-мозговой травме. Практическое пособие в 3-х томах. (Ред. А. Н. Коновалов, Л. Б. Лихтерман, А. А. Потапов). Москва: Антидор, 2002. [Clinical manual of head injury, 2002. (Eds Konovalov AN, Likhterman LB, Potapov AA). Moscow: Antidor (in Russian)].
40. Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow*. 2004;24(2):133–50.
41. Greve MW, Zink BJ. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Mt Sinai J Med*. 2009;76:97–104.
42. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(2):128–42.
43. Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol*. 2004;14(2):215–22.
44. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007;99(1):4–9.
45. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):366–77.
46. Mannix R, Berglass J, Berkner J, Moleus P, Qiu J, Andrews N et al Chronic gliosis and behavioral deficits in mice following repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 2014;121:1342–50.
47. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(4):201–10.
48. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 1999;49(6):377–91.
49. Pannese E. *Neurocytology: Fine Structure of Neurons, Nerve Processes, and Neuroglial Cells*. 2nd ed. Switzerland: Springer; 2015.
50. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB. Microglia Promote Learning-Dependent Synapse

- Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell*. 2013;7:1596–609.
51. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*. 2016;3:316–27.
52. What Is the Glasgow Coma Scale? [Internet]. 2018 Feb 13 [cited 2020 Mar 14]. Available from: <https://www.brainline.org/article/what-glasgow-coma-scale>.
53. Saatman KE, Duhaime A-C, Bullock R, Maas AIR, Valadka A, Manley GT et al Classification of Traumatic Brain Injury for Targeted Therapies. *J Neurotrauma*. 2008;25:719–38.
54. Andriessen TM, Jacobs B, Vos PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J Cell Mol Med*. 2010;14(10):2381-92.
55. Cantu RC. Chronic traumatic encephalopathy in the National Football League. *Neurosurgery*. 2007;61(2):223–5.
56. Jordan B. *Medical Aspects of Boxing*. 1st ed. CRC Press; 1992.
57. Turner RC, Lucke-Wold BP, Robson MJ, Omalu BI, Petraglia AL, Bailes JE. Repetitive traumatic brain injury and development of chronic traumatic encephalopathy: a potential role for biomarkers in diagnosis, prognosis, and treatment? *Front Neurol*. 2013;3:1–11.
58. Mitsis EM, Riggio S, Kostakoglu L, Dickstein DL, Machac J, Delman B et al Tauopathy PET and amyloid PET in the diagnosis of chronic traumatic encephalopathies: studies of a retired NFL player and of a man with FTD and a severe head injury. *Transl Psychiatry*. 2014;4:1–8.
59. Croall ID, Cowie CJA, Peel A, Wood J, Aribisala BS, Mitchell P et al White matter correlates of cognitive dysfunction after mild traumatic brain injury. *Neurology*. 2014;83(6):1–8.
60. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011;377(9770):1019–31.

61. Tang BL. Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease. *Cell Adh Migr.* 2009;3(1):118–28.
62. Johnson VE, Smith DH. Traumatic brain injury and amyloid- β pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(5):361–70.
63. Gardner RC, Burke JF, Nettiksimmons J, Goldman S, Tanner CM, Yaffe K. Traumatic Brain Injury in Later Life Increases Risk for Parkinson Disease. *Ann Neurol.* 2015;1–9.
64. Kristman VL, Marras C, Hincapie CA, Cancelliere C, Soklaridis S, Li A et al Systematic Review of the Risk of Parkinson's Disease After Mild Traumatic Brain Injury: Results of the International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury Prognosis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2014;95:238-44.
65. Christensen J, Pedersen MG, Pedersen CB, Sidenius P, Olsen J, Vestergaard M. Long-term risk of epilepsy after traumatic brain injury in children and young adults : a population-based cohort study. *Lancet.* 1995;373:1105–10.
66. Fisher RS, Boas WVE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P et al Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005;46(4):470–2.
67. Sick T, Wasserman J, Bregy A, Sick J, Dietrich WD, Bramlett HM. Increased Expression of Epileptiform Spike/Wave Discharges One Year after Mild, Moderate, or Severe Fluid Percussion Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma.* 2017;34:2467–74.
68. Shandra O, Winemiller AR, Heithoff BP, Munoz-Ballester C, Benko MJ, Mey A et al Repetitive Diffuse Mild Traumatic Brain Injury Causes an Atypical Astrocyte Response and Spontaneous Recurrent Seizures. *J Neurosci.* 2019;39(10):1944–63.
69. Sullivan HG, Martinez J, Becker DP, Miller JD, Griffith R, Wist AO. Fluid-percussion model of mechanical brain injury in the cat. *J Neurosurg.* 1976; 45(5):521–34.

70. Lyeth BG. Historical review of the fluid-percussion TBI model. *Front Neurol.* 2016;7:1–7.
71. Raghupathi R, Margulies SS. Traumatic axonal injury after closed head injury in the neonatal pig. *J Neurotrauma.* 2002;19(7):843–53.
72. Ghabriel MN, Zhu C, Reilly PL, Blumbergs PC, Manavis J, Finnie JW. Toxin-induced vasogenic cerebral oedema in a rat model. *Acta Neurochir Suppl.* 2000;76:231–6.
73. Laurer HL, Meaney DF, Margulies SS, McIntosh TK. Modeling Brain Injury/Trauma. In: Ramachandran VS, editor. *Encyclopedia of Human Brain.* San Diego: Academic Press; 2002.
74. Kabadi SV, Hilton GD, Stoica BA, Zapple DN, Faden AI. Fluid-percussion-induced traumatic brain injury model in rats. *Nat Protoc.* 2010;5(9):1552–63.
75. Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological and Rehabilitational Aspects.* Gainsville, FL: CRC Press; 2015.
76. Chen J, Xiu X-M, Xu ZC, Zhang JH, editors. *Animal Models of Acute Neurological Injuries.* Totowa, NJ: Humana Press; 2009.
77. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res.* 1981;211(1):67–77.
78. Marmarou A, Montasser A, Foda AE, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994;112(2):291–300.
79. Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg.* 1994;80:301–13.
80. Cernak I, Noble-Haesslein LJ. Traumatic brain injury: an overview of pathobiology with emphasis on military populations. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30:255–66.

81. Wang Z, Sun L, Yang Z, Leng H, Jiang J, Yu H, Gu J, Li Z. Development of serial bio-shock tubes and their application. *Chin Med J (Engl)*. 1998;111(2):109–13.
82. Ning YL, Zhou YG. Shock tubes and blast injury modeling. *Chinese J Traumatol – English Ed*. 2015;18(4):187–93.
83. Saljo A, Hamberger A. Intracranial sound pressure levels during impulse noise exposure. Paper presented at: 7th International Neurotrauma Symposium; 2004 Sept 12–16; Adelaide, Australia.
84. Leung LY, VandeVord PJ, Dal Cengio AL, Bir C, Yang KH, King AI. Blast related neurotrauma: a review of cellular injury. *Mol Cell Biomech*. 2008;5(3):155–68.
85. Kane MJ, Angoa-Perez M, Briggs DI, Viano DC, Kreipke CW, Kuhn DM. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosci Methods*. 2012;203(1):41–9.
86. Ando K, Leroy K, Héraud C, Yilmaz Z, Authelet M, Suain V, Decker RD, Brion JP. Accelerated human mutant tau aggregation by knocking out murine tau in a transgenic mouse model. *Am J Pathol*. 2011;178(2):803–16.
87. Lucke-Wold BP, Logsdon AF, Nguyen L, Eltanahay A, Turner RC, Bonasso P, Knotts C, Moeck A, Maroon JC, Bailes JE, Rosen CL. Supplements, nutrition, and alternative therapies for the treatment of traumatic brain injury. *Nutr Neurosci*. 2018;21(2):79–91.
88. Koza L, Linseman D. Glutathione precursors shield the brain from trauma. *Neural Regen Res*. 2019;14(10):1701–2.
89. Hiebert JB, Shen Q, Thimmesch AR, Pierce JD. Traumatic Brain Injury and Mitochondrial Dysfunction. *Am J Med Sci*. 2015;350(2):132–8.
90. Nijveldt R. Flavonoids : a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:418–25.
91. Bastianetto S, Quirion R. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol Aging*. 2002;23:891–7.

92. Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K et al Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci.* 2007;104:329–34.
93. Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):673–751.
94. Scheff SW, Ansari MA, Roberts KN. Neuroprotective effect of Pycnogenol® following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2013;(239):183–191.
95. Patel K. Quercetin [Internet]. 2018 Sep 13 [2020 Mar 14]. Available from: <https://examine.com/supplements/quercetin/>.
96. Tchanchou F, Lacor PN, Cao Z, Lao L, Hou Y, Cui C et al Stimulation of neurogenesis and synaptogenesis by bilobalide and quercetin via common final pathway in hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis.* 2009;18(4):787–98.
97. Yao RQ, Qi DS, Yu HL, Liu J, Yang LH, Wu XX. Quercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway. *Neurochem Res.* 2012;37(12):2777–86.
98. Kelly GS. Quercetin. Monograph. *Altern Med Rev.* 2011;16(2):172-9.
99. Schültke E, Kamencic H, Zhao MIN, Tian G, Baker AJ, Griebel RW, et al Neuroprotection following Fluid Percussion Brain Trauma: A Pilot Study Using Quercetin. *J Neurotrauma.* 2005;22(12):1475–84.
100. Schültke E, Kamencic H, Skihar VM, Griebel R, Juurlink B. Quercetin in an animal model of spinal cord compression injury: correlation of treatment duration with recovery of motor function. *Spinal Cord.* 2010;48(2):112-7.
101. Schültke E, Griebel RW, Juurlink BHJ. Quercetin Administration After Spinal Cord Trauma Changes S-100 β Levels. *Can J Neurol Sci.* 2009;37:223–8.

102. Коваленко ТМ, Осадченко ІО, Цупиков ОМ, Півнева ТА, Шаламай АС, Мойбенко ОО, Скибо ГГ. Нейропротекторний ефект кверцетину при експериментальній ішемії мозку. *Фізіол журн.* 2006;52(5):21-27.
103. Curzon P, Zhang M, Radek RJ, Fox JB. The Behavioral Assessment of Sensorimotor Processes in the Mouse: Acoustic Startle, Sensory Gating, Locomotor Activity, Rotarod, and Beam Walking. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. CRC Press; 2009. 343 p.
104. Deacon RMJ, Rawlins JNP. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc.* 2006;1(1):7–12.
105. Kawai N, Kawanishi M, Okauchi M, Nagao S. Effects of hypothermia on thrombin-induced brain edema formation. *Brain Res.* 2001;895:50–8.
106. Masada T, Hua Y, Xi G, Ennis SR, Keep RF. Attenuation of Ischemic Brain Edema and Cerebrovascular Injury After Ischemic Preconditioning in the Rat. *J Cerebr Blood F Met.* 2001;21:22–33.
107. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp.* 2012;65:1–9.
108. Pivneva TA, Tsupikov OM, Pilipenko MN, Vasilenko DA, Skibo GG. Structural modifications of astrocytes in the hippocampus after experimental cerebral ischemia in gerbils. *Neurophysiology.* 2005;37(5):359-64.
109. Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed. Academic Press; 2001.
110. Zabenko YY, Pivneva TA. Behavioral reactions and structural alterations of hippocampal tissue after repetitive mild traumatic brain injury in mice. *Studia UBB Biologia.* 2014;59(2):63-71.
111. Забенько СЮ, Півнева ТА. Вплив повторної легкої черепно-мозкової травми на поведінку мишей у «Відкритому полі». *Світ медицини та біології.* 2015;1(48):122–125.

112. Csordás A, Mázló M, Gallyas F. Recovery versus death of “dark” (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: Light and electron microscopic observations. *Acta Neuropathol.* 2003;106(1):37–49.
113. Zabenko YY, Pivneva TA. Flavonoid quercetin reduces gliosis after repetitive mild traumatic brain injury in mice. *Fiziol Zh.* 2016;62(5):50–57.
114. Забенцько ЄЮ, Атамас АВ, Півнева ТА. Легка черепно-мозкова травма: загальна характеристика, нейродегенеративні наслідки та моделювання. *Fiziol Zh.* 2017;63(3):80–89.
115. Чайка АВ, Забенцько ЕЮ, Лабунец ИФ, Пивнева ТА. Черепно-мозговая травма: патогенез, экспериментальные модели, перспективы клеточной терапии. *Клітинна та органна трансплантологія.* 2017;5(2):200–216.
116. Leo P, McRea M. Epidemiology. In: Laskowitz D, Grant G, editors. *Translational Research in Traumatic Brain Injury.* CRC Press; 2016.
117. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet.* 1974;304(7872):81–84.
118. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma.* 2008;25(4):324–33.
119. Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA, McIntosh TK. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma.* 2005;22(1):42–75.
120. Washington PM, Forcelli PA, Wilkins T, Zapple DN, Parsadonian M, Burns MP. The effect of injury severity on behavior: a phenotypic study of cognitive and emotional deficits after mild, moderate and severe controlled cortical impact injury in mice. *J Neurotrauma.* 2012;29(13):2283–96.
121. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc.* 2009;4(9):1328–37.

122. Markgraf CG, Clifton GL, Aguirre M, Chaney SF, Knox-Du Bois C, Kennon K, Verma N. Injury severity and sensitivity to treatment after controlled cortical impact in rats. *J Neurotrauma*. 2001;18(2):175–86.
123. Konrad K, Gauggel S, Manz A, Scholl M. Inhibitory control in children with traumatic brain injury (TBI) and children with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Brain Inj*. 2000;14(10):859–75.
124. Homsí S, Piaggio T, Croci N, Noble F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Blockade of acute microglial activation by minocycline promotes neuroprotection and reduces locomotor hyperactivity after closed head injury in mice: a twelve-week follow-up study. *J Neurotrauma*. 2010;27(5):911–21.
125. Cheng JS, Craft R, Yu GQ, Ho K, Wang X, Mohan G, et al Tau reduction diminishes spatial learning and memory deficits after mild repetitive traumatic brain injury in mice. *PLoS One*. 2014;9(12):1–17.
126. Ghadiri T, Sharifzadeh M, Khodagholi F, Moddares Musavi SM, Hasanzadeh G, Zarindast M et al A novel traumatic brain injury model for induction of mild brain injury in rats. *J Neurosci Methods*. 2014;233:18–27.
127. Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(1):45–59.
128. Spruijt BM, Welbergen P, Brakkee J, Gispen WH. An ethological analysis of excessive grooming in young and aged rats. *Ann NY Acad Sci*. 1988;525:89–100.
129. Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Herrera-Mundo N, Viano DC, Kuhn DM. Animal models of sports-related head injury: bridging the gap between pre-clinical research and clinical reality. *J Neurochem*. 2014;129(6):916–31.
130. Surget A., Saxe M., Leman S., Ibarguen-Vargas Y., Chalon S., Griebel G., Hen R. and Belzung C. Drug-dependent requirement of hippocampal

- neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal *Biol. Psychiatry*. 2008;64(4):293–301.
131. Heuser I. Anna-Monika-Prize paper. The hypothalamic-pituitary-adrenal system in depression. *Pharmacopsychiatry*. 1998;31(1):10–3.
 132. Varghese FP, Brown ES. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in major depressive disorder: A brief primer for primary care physicians. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 2001;3(4):151–5.
 133. Carter M, Shieh J. Guide to research techniques in neuroscience. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Elsevier; 2009.
 134. Pandey DK, Yadav SK, Mahesh R, Rajkumar R. Depression-like and anxiety-like behavioural aftermaths of impact accelerated traumatic brain injury in rats: A model of comorbid depression and anxiety? *Behav Brain Res*. 2009;205(2):436–42.
 135. Bartsch T., editor. *The Clinical Neuobiology of the Hippocampus: An Integrative view*. 1st ed. Oxford University Press; 2012.
 136. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*. 2015;309:1–16.
 137. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*. 1982;11(5):491–8.
 138. Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*. 1991;40(3):599–636.
 139. Ishida K, Shimizu H, Hida H, Urakawa S, Ida K, Nishino H. Argyrophilic dark neurons represent various states of neuronal damage in brain insults: Some come to die and others survive. *Neuroscience*. 2004;125(3):633–44.
 140. Gallyas F, Farkas O, Mázló M. Gel-to-gel phase transition may occur in mammalian cells: Mechanism of formation of “dark” (compacted) neurons. *Biol Cell*. 2004;96(4):313–24.
 141. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*. 2016;275:316–27.

142. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91(2):461–553.
143. Mouzon B, Chaytow H, Crynen G, Bachmeier C, Stewart J, Mullan M et al Repetitive mild traumatic brain injury in a mouse model produces learning and memory deficits accompanied by histological changes. *J Neurotrauma.* 2012;29(18):2761–73.
144. Мойбенко ОО, Кубишкін АВ, Харченко ВЗ, Горохова НЮ, Семенець ПФ. Експериментальні підходи до профілактики та лікування гострого ушкодження легень з використанням інгібіторів протеїназ і корвітину. *Фізіол журн.* 2003;49(4):63–7.
145. Tkachenko V, Kovalchuk Y, Bondarenko N, Bondarenko O, Ushakova G, Shevtsova A. The Cardio- and Neuroprotective Effects of Corvitin and 2-Oxoglutarate in Rats with Pituitrin-Isoproterenol-Induced Myocardial Damage. *Biochem Res Int.* 2018.
146. Shiyntum HN, Dovban OO, Kovalchuk YP, Yaroshenko TY, Ushakova GA. Corvitin restores metallothionein and glial fibrillary acidic protein levels in rat brain affected by pituitrin-izadrin. *Ukr Biochem J.* 2017;89(3):36–45.
147. Pashevin DA, Tumanovska LV, Dosenko VE, Nagibin VS, Gurianova VL, Moibenko AA. Antiatherogenic effect of quercetin is mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes. *Pharmacol Reports.* 2011;63(4):1009–18.
148. Slobounov SM, Sebastianelli WJ, editors. *Concussions in Athletics: From Brain to Behaviour.* Springer; 2014.
149. Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. Pharmacology of Traumatic Brain Injury: Where Is the “Golden Bullet”? *Mol Med.* 2008;14(11–12):731–40.
150. Slemmer JE, Shacka J., Weber JT. Antioxidants and Free Radical Scavengers for the Treatment Of Stroke, Traumatic Brain Injury and Aging. *Curr Med Chem.* 2008;15:404–14.

151. Amanzadeh E, Esmaeili A, Rahgozar S, Nourbakhshnia M. Application of quercetin in neurological disorders: From nutrition to nanomedicine. *Rev Neurosci*. 2019;30(5):555–72.
152. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(4):481–6.
153. Juurlink BHJ, Paterson PG. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: Suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med*. 1998;21(4):309–34.
154. Matz PG, Fujimura M, Chan PH. Subarachnoid hemolysate produces DNA fragmentation in a pattern similar to apoptosis in mouse brain. *Brain Res*. 2000;858(2):312–9.
155. Schültke E, Kendall E, Kamencic H, Ghong Z, Griebel RW, Juurlink BHJ. Quercetin promotes functional recovery following acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2003;20(6):583–91.
156. Iwasaki Y, Shiojima T, Kinoshita M. S100 beta prevents the death of motor neurons in newborn rats after sciatic nerve section. *J Neurol Sci*. 1997;151(1):7–12.
157. Haglid KG, Yang Q, Hamberger A, Bergman S, Widerberg A, Danielsen N. S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res*. 1997;753(2):196–201.
158. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1–21.
159. Yang T, Kong B, Gu J-W, Kuang Y-Q, Cheng L, Yang W-T et al Anti-apoptotic and anti-oxidative roles of quercetin after traumatic brain injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2014;34(6):797–804.

160. Yang T, Kong B, Gu J-W, Kuang Y-Q, Cheng L, Yang W-T, et al Anti-apoptotic and anti-oxidative roles of quercetin after traumatic brain injury. *Cell Mol Neurobiol.* 2014;34(6):797–804.
161. Du G, Zhao Z, Chen Y, Li Z, Tian Y, Liu Z et al Quercetin protects rat cortical neurons against traumatic brain injury. *Mol Med Rep.* 2018;17(6):7859–65.
162. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(5):249–63.
163. Voet S, Prinz M, van Loo G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends Mol Med.* 2019;25(2):112–23.
164. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol.* 2016;37(9):608–20.
165. Khan A, Ali T, Rehman SU, Khan MS, Alam SI, Ikram M, et al Neuroprotective Effect of Quercetin Against the Detrimental Effects of LPS in the Adult Mouse Brain. *Front Pharmacol.* 2018;9:1–16.
166. Leung YKJ, Pankhurst M, Dunlop SA, Ray S, Dittmann J, Eaton ED, et al Metallothionein induces a regenerative reactive astrocyte phenotype via JAK/STAT and RhoA signalling pathways. *Exp Neurol.* 2010;221(1):98–106.
167. Chung RS, Adlard PA, Dittmann J, Vickers JC, Chuah MI, West AK. Neuron-glia communication: metallothionein expression is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury. *J Neurochem.* 2003;88(2):454–61.
168. Fan H, Tang H Bin, Shan LQ, Liu SC, Huang DG, Chen X, et al Quercetin prevents necroptosis of oligodendrocytes by inhibiting macrophages/microglia polarization to M1 phenotype after spinal cord injury in rats. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):1–15.
169. Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, PassosdosSantos R, Gaestel M, David S. TNF and Increased Intracellular Iron Alter Macrophage Polarization

- to a Detrimental M1 Phenotype in the Injured Spinal Cord. *Neuron*. 2014;83(5):1098–116.
170. Fan H, Zhang K, Shan L, Kuang F, Chen K, Zhu K, et al Reactive astrocytes undergo M1 microglia/macrophages-induced necroptosis in spinal cord injury. *Mol Neurodegener*. 2016;11(1):1–16.
171. Kom HH, Nageshwar M, Srilatha K, Reddy KP. Protective effect of quercetin on weight drop injury model-induced neuroinflammation alterations in brain of mice. *J Appl Pharm Sci*. 2019;9(4):96–103.
172. Miguel A, Burguillos T, Deierborg EK, Annette P, Nabil H, Albert GQ et al Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*. 2011; 472(7343):319–23.
173. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(4):201–10.
174. Jeter CB, Hergenroeder GW, Hylin MJ, Redell JB, Moore AN, Dash PK. Biomarkers for the diagnosis and prognosis of mild traumatic brain injury/concussion. *J Neurotrauma*. 2013;30(8):657–70.
175. Turner RC, Lucke-Wold BP, Robson MJ, Omalu BI, Petraglia AL, Bailes JE. Repetitive traumatic brain injury and development of chronic traumatic encephalopathy: a potential role for biomarkers in diagnosis, prognosis, and treatment? *Front Neurology*. 2013;3(186).
176. Perez AM, Adler J, Kulkarni N, Strain JF, Womack KB, Diaz-Arrastia R et al Longitudinal white matter changes after traumatic axonal injury. *J Neurotrauma*. 2014;31(17):1478–85.
177. Shahim P, Zetterberg H, Tegner Y, Blennow K. Serum neurofilament light as a biomarker for mild traumatic brain injury in contact sports. *Neurology*. 2017;88(19):1788–94.
178. Zetterberg H, Hietala MA, Jonsson M, Andreasen N, Styrud E, Karlsson I et al Neurochemical aftermath of amateur boxing. *Arch Neurol*. 2006;63(9):1277–80.

179. Neselius S, Brisby H, Theodorsson A, Blennow K, Zetterberg H, Marcusson J. CSF-biomarkers in olympic boxing: Diagnosis and effects of repetitive head trauma. *PLoS One*. 2012;7(4):1–8.
180. Zetterberg H, Blennow K. Fluid biomarkers for mild traumatic brain injury and related conditions. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(10):563–74.
181. Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. 2010;7(8):656–64.
182. Omalu BI, DeKosky ST, Minster RL, Kamboh MI, Hamilton RL, Wecht CH. Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery*. 2005;57(1):128–33.
183. Goldstein LE, Fisher AM, Tagge CA, Zhang X, Sullivan JA, Upreti C et al Chronic Traumatic Encephalopathy in Blast-Exposed Military Veterans and a Blast Neurotrauma Mouse Model. *Sci Transl Med*. 2013;4(134).
184. Positron emission tomography scan [Internet]. 2019 May 24 [2020 Mar 14]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/pet-scan/about/pac-20385078>.
185. Higuchi M. Tau PET Imaging. In: Takashima A, Wolozin B, Buee L, editors. *Tau Biology*. Springer; 2019. 405 p.
186. Mase M, Nagai H, Kabasawa H, Ogawa T, Iida A, Yamada K. Cerebral blood flow and metabolism in patients with cognitive impairments after minor traumatic brain injury: PET study in a chronic state. *Int Congr Ser*. 2004;1259:365–9.
187. Lin AP, Liao HJ, Merugumala SK, Prabhu SP, Meehan WP, Ross BD. Metabolic imaging of mild traumatic brain injury. *Brain Imaging Behav*. 2012;6(2):208–23.
188. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2013;246:35–43.
189. Smith DH, Hicks R, Povlishock JT. Therapy development for diffuse axonal injury. *J Neurotrauma*. 2013;30(5):307–323.

190. Vascak M, Jin X, Jacobs KM, Povlishock JT. Mild Traumatic Brain Injury Induces Structural and Functional Disconnection of Local Neocortical Inhibitory Networks via Parvalbumin Interneuron Diffuse Axonal Injury. *Cereb Cortex*. 2018;28(5):1625–44.
191. Mori S, Zhang J. Principles of Diffusion Tensor Imaging and Its Applications to Basic Neuroscience Research. *Neuron*. 2006;51(5):527–39.
192. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion Tensor Imaging of the Brain. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. 2007;4:316–29.
193. Mayer AR, Mannell M V, Ling J, Gasparovic C, Yeo R a. Functional connectivity in mild traumatic brain injury. *Hum Brain Mapp*. 2011;32:1825–35.
194. Maller JJ, Thomson RHS, Lewis PM, Rose SE, Pannek K, Fitzgerald PB. Traumatic brain injury, major depression, and diffusion tensor imaging: Making connections. *Brain Res Rev*. 2010;64(1):213–40.
195. Asken BM, DeKosky ST, Clugston JR, Jaffee MS, Bauer RM. Diffusion tensor imaging (DTI) findings in adult civilian, military, and sport-related mild traumatic brain injury (mTBI): a systematic critical review. *Brain Imaging Behav*. 2018;12(2):585–612.

ДОДАТОК 1. СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Zabenko Y. Y., Pivneva T. A. (2014). Behavioral reactions and structural alterations of hippocampal tissue after repetitive mild traumatic brain injury in mice. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia*, 59(2), 63-71. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).
2. Забенько Є. Ю., Півнева Т. А. (2015). Вплив повторної легкої черепно-мозкової травми на поведінку мишей у «Відкритому полі». *Світ медицини та біології*, 1(48), 122-125. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, і підготовці матеріалів статті до публікації).
3. Zabenko Y. Y., Pivneva T. A. (2016). Flavonoid quercetin reduces gliosis after repetitive mild traumatic brain injury in mice. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 62(5), 50-57. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, і підготовці матеріалів статті до публікації).
4. Забенько Є. Ю., Атамас А. В., Півнева Т. А. (2017). Легка черепно-мозкова травма: загальна характеристика, нейродегенеративні наслідки та моделювання. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 63(3), 80-89.

(Особистий внесок здобувача полягає у аналізі наукової літератури та формулюванні висновків щодо сучасного стану проблеми).

5. Чайка А. В., Забенько Е. Ю., Лабунец И. Ф., Пивнева Т. А. (2017). Черено-мозговая травма: патогенез, экспериментальные модели, перспективы клеточной терапии. *Клітинна та органна трансплантологія*, 5(2), 200-216. *(Особистий внесок здобувача полягає у аналізі наукової літератури).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Забенько Є. Ю., Пивнева Т. А. (2013). Модель повторюваної травми головного мозку для вибору потенційних методів лікування. *Physiology: from Molecules to Organism*, Kyiv, Ukraine, October 24-25, 34-35. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
2. Zabenko Y., Pivneva T. (2014). Structural changes of hippocampal CA1 zone in a mouse model of repetitive mild traumatic brain injury. *Young Researchers in BioSciences*, Cluj-Napoca, Romania, July 23-27, 44. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
3. Zabenko Y., Pivneva T. (2015). Effects of repetitive mild brain trauma on behaviour and hippocampal structure in mice. *Conference for Young Scientists*, Kyiv, Ukraine, September 21-25, 135. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
4. Забенько Є. Ю., Атамас А. В., Пивнева Т. А. (2016). Вплив корвітину на процеси гліюзу в СА1 зоні гіпокампа при повторюваній легкій черепно-мозковій травмі в мишей. *XII Національна школа молодих вчених-фармакологів ім. Академіка НАМН України О. В. Стефанова*, Київ, Україна, 12 жовтня. *Публікація тез, усна доповідь.*

5. Забенько Є. Ю., Півнева Т. А. (2017). Введення кверцетину призводить до зменшення гліюзу в моделі повторюваної легкої черепно-мозкової травми у мишей. *VIII Конгрес Українського товариства нейронаук*, Київ, Україна, 7-11 червня, 85-86. *Публікація тез, усна доповідь.*
6. Лабунец І. Ф., Родниченко А. Е., Утко Н. А., Чайковский Ю. Б., Мельник Н. А., Півнева Т. А., Савосько С. І., Забенько Е. Ю., Демидчук А. С., Шамало С. Н., Копьяк Б. С., Сагач В. Ф., Бутенко Г. М. (2017) “Нейропротекторное влияние мелатонина при экспериментальных моделях патологии нервной системы: возможные механизмы. *Клітинна та органна трансплантологія*, 5(2), 41 (Науково-практична конференція з міжнародною участю "Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині, Київ, Україна, 9-10 листопада). *Публікація тез.*
7. Labunets I., Rodnichenko A., Utko N., Chaikovsky Y., Melnyk N., Pivneva T., Savosko S., Zabenko Y., Demydchuk A., Shamalo S., Кор’як В., Sagach V., Butenko G. (2018). Neuroprotective effect of melatonin in experimental models of the nervous system pathologies. *Abstracts of 2nd neurology and rehabilitation international symposium “Neuroregeneration” to commemorate prof. Oleksandr Chernyakhivsky*, Kyiv, Ukraine, October 5, 2018, 14-15. *Публікація тез.*