

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Науменко Яна Олегівна

УДК 573, 576, 577, 612.8

ДИСЕРТАЦІЯ

Розподіл глутаматного транспортера GLT-1 у гіпокампі мишей після легкої
черепно-мозкової травми та його корекція цефтріаксоном

09 Біологія

091 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело. Інструменти штучного інтелекту застосовувалися виключно як допоміжні засоби для редагування тексту, що детально описано у відповідному розділі роботи

Науменко Я.О. _____

Науковий керівник: Півнева Тетяна Андріївна, доктор біологічних наук,
провідний науковий співробітник відділу біофізики сенсорної сигналізації
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця

Київ – 2026

SUMMARY

Y. Naumenko. Distribution of the GLT-1 glutamate transporter in the hippocampus of mice following mild traumatic brain injury and its modulation by ceftriaxone. — Qualification scientific work as a manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 – Biology, specialty 091 – Biology. Bogomoletz Institute of physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2026.

This dissertation examines the distribution dynamics and expression level of the glutamate transporter GLT-1 (EAAT2) in astrocytes and pyramidal neurons of the hippocampal CA1 region in mice following mild traumatic brain injury (mTBI), and investigates the effect of ceftriaxone on these processes. Using confocal laser scanning microscopy and semi-automated fluorescence image analysis, it was established that mTBI induces GLT-1 clustering in both cell types: on day 3 post-injury, the mean intensity of individual GLT-1 clusters in astrocytes doubles, while total transporter fluorescence decreases by 56.9%. In neurons, a reduction in the relative area and relative intensity of GLT-1 clusters is observed.

Administration of ceftriaxone (250 mg/kg intraperitoneally for 5 days) following mild traumatic brain injury inhibits post-traumatic accumulation of GLT-1 and promotes the restoration of uniform distribution of transporters.

This effect is most pronounced on the 3rd and 14th days after the injury and does not persist after the completion of treatment. A mechanism has been proposed whereby excessive accumulation of glutamate in the extracellular space following mild traumatic brain injury (mTBI) causes GLT-1 clustering, disrupting its transport function. Ceftriaxone, by influencing the transporter's life cycle, restores the physiological distribution of GLT-1 and is a promising neuroprotective agent.

In cases of mild traumatic brain injury (mTBI), the localization of GLT-1 in the somata of pyramidal neurons (Striatum Pyramidale) in the CA1 region of the

hippocampus has been demonstrated, expanding our understanding of the cellular targets of post-traumatic excitotoxicity

The findings highlight the importance of considering GLT-1 spatial distribution, rather than expression level alone, when evaluating neuroprotective strategies.

Keywords: Antibiotics, Restoration, Hippocampal Structure, Excitation, Neurotransmitter release, Glutamate, Brain, Brain Injuries, Traumatic Complications, Neuroprotection, Astroglia, Stroke, Hippocampus, Neurons, Traumatic brain injury, Neuroinflammation, Fluorescent cell labelling, Glutamate transporter 1

АНОТАЦІЯ

Науменко Я.О. Розподіл глутаматного транспортера GLT-1 у гіпокампі мишей після легкої черепно-мозкової травми та його корекція цефтріаксоном - кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 - Біологія за спеціальністю 091 Біологія. Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2026.

У дисертаційній роботі вивчено динаміку розподілу та рівень експресії глутаматного транспортера GLT-1 (EAAT2) в астроцитах і сомах пірамідних нейронах зони CA1 гіпокампу мишей після легкої черепно-мозкової травми (лЧМТ) та досліджено вплив цефтріаксону на ці процеси. Методами конфокальної лазерної мікроскопії та напівавтоматичного аналізу флуоресцентних зображень встановлено, що лЧМТ індукує кластеризацію GLT-1 в обох типах клітин: на 3-й день після травми середня інтенсивність кожного GLT-1-кластеру в астроцитах подвоюється, тоді як загальна флуоресценція транспортера знижується на 56,9%. У нейронах реєструється зниження відносної площі та відносної інтенсивності GLT-1-кластерів.

Введення цефтріаксону (250 мг/кг внутрішньоочеревинно, протягом 5 діб) після лЧМТ пригнічує посттравматичну кластеризацію GLT-1 та сприяє відновленню рівномірного розподілу транспортера.

Ефект найбільш виражений на 3-й та 14-й дні після травми і суттєво послаблюється після закінчення курсу введення, зберігаючись лише як залишкова різниця за площею GLT-1-кластерів. Запропоновано механізм, згідно з яким надмірне позаклітинне накопичення глутамату після лЧМТ стимулює кластеризацію GLT-1, порушуючи його транспортну функцію. Цефтріаксон, впливаючи на «цикл існування» транспортера, відновлює фізіологічний розподіл GLT-1 і є перспективним нейропротективним агентом.

Виявлено локалізацію GLT-1 у сомах пірамідальних нейронів у *Stratum Pyramidale* зони CA1 гіпокампу в умовах легкої черепно-мозкової травми, що розширює розуміння клітинних мішеней посттравматичної ексайтотоксичності.

Результати роботи обґрунтовують необхідність врахування просторового розподілу GLT-1, а не лише рівня його експресії, при оцінці ефективності нейропротективних стратегій.

Ключові слова: Антибіотики, Відновлення, Структура гіпокампу, Збудження, Вивільнення нейромедіаторів, Глутамат, Мозок, Травми мозку, Травматичні ускладнення, Нейропротекція, Астроглія, Інсульт, Гіпокамп, Нейрони, Травматичне ураження мозку, Нейрозапалення, Флуоресцентне маркування клітин, Транспортёр глутамату 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЙНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

В яких опубліковано основні результати дисертаційного дослідження:

- 1) **Naumenko Y**, Olifirov B, Yuryshynets I, Pivneva T. Ceftriaxone has a similar effect on astrocytic and neuronal GLT-1 distribution after mild traumatic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 822:153895. [Q2](#)
DOI [10.1016/j.bbrc.2026.153895](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2026.153895)
- 2) **Naumenko Y**, Yuryshinets I, Zabenko Y, Pivneva T. Mild traumatic brain injury as a pathological process. *Heliyon* 9(7). [Q1](#)
DOI [10.1016/j.heliyon.2023.e18342](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18342)

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

- 1) Yana Naumenko, Borys Olifirov, Nana Voitenko, Tetyana Pivneva. “Application of the ceftriaxone changes the GLT-1 distribution after traumatic brain injury”. *FENS Forum 2022, Париж, Франція.*
- 2) Науменко Я., Оліфіров Б., Войтенко Н., Півнева Т. “Застосування цефтріаксону впливає на розподіл GLT-1 після легкої черепно-мозкової травми”.
Всеукраїнська конференція з нейронаук з міжнародною участю, Київ , Україна
- 3) Yana Naumenko, Tetyana Pivneva. “The use of ceftriaxone improves the structure of the hippocampal CA1 area and reduces behavioral problems in mice with mild traumatic brain injuries”.
“XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених”, Львів, Україн

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	9
ВСТУП.....	11
Актуальність теми	11
Зв'язок роботи з науковими програмами	12
Мета і завдання дослідження	12
Об'єкт і предмет дослідження	13
Методи дослідження	13
Наукова новизна одержаних результатів.....	15
Практичне значення одержаних результатів.....	15
Особистий внесок здобувача.....	16
Апробація результатів дисертації.....	16
Публікації.....	17
Структура та обсяг дисертації.....	17
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	18
1.1. Черепно-мозкова травма: визначення, епідеміологія та класифікація.....	18
1.1.1. Визначення та загальна характеристика.....	18
1.1.2. Епідеміологія	21
1.1.3. Класифікація	22
1.2. Біомеханіка легкої черепно-мозкової травми	23
1.3. Патофізіологія легкої черепно-мозкової травми	25
1.3.1. Первинне ушкодження та порушення клітинного гомеостазу.....	25
1.3.2. Оксидативний стрес при лЧМТ	26
1.3.3. Метаболічні зміни та мітохондріальна дисфункція	27
1.3.4. Дифузне пошкодження аксонів	28

1.4. Нейрозапалення та реакція гліальних клітин при лЧМТ	30
1.4.1. Астроцити	30
1.4.2. Мікроглія.....	32
1.4.3. Нейрони при лЧМТ	34
1.5. Роль глутамату та ексайтотоксичності при черепно-мозковій травмі	35
1.5.1. Глутаматна ексайтотоксичність.....	35
1.5.2. Порухення зворотного захоплення глутамату при ЧМТ	36
1.6. Глутаматний транспортер GLT-1: структура, функції та регуляція.....	37
1.6.1. Молекулярна характеристика GLT-1	37
1.6.2. Мобільність та кластеризація GLT-1	39
1.6.3. Нейрональна GLT-1	41
1.7. Цефтріаксон як модулятор GLT-1 при неврологічних розладах	42
1.7.1. Механізм нейропротективної дії цефтріаксону	42
1.7.2. Цефтріаксон при черепно-мозковій травмі	43
1.8. Гіпокамп при легкій черепно-мозковій травмі	44
1.8.1. Вразливість гіпокампу та зони CA1	44
1.8.2. Нейрогліальна взаємодія у гіпокампі після ЧМТ	45
1.9. Поведінкові та функціональні наслідки лЧМТ	46
1.10. Клінічні випробування та терапевтичні стратегії при ЧМТ	47
1.11. Обґрунтування дослідження та невирішені питання	49
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	50
2.1. Лабораторні тварини та дизайн дослідження.....	50
2.2. Модель легкої черепно-мозкової травми.....	52
2.3. Оцінка відновлення рефлексу випрямлення	54

2.4. Введення цефтріаксону.....	54
2.5. Перфузія та підготовка тканини	55
2.6. Протокол імуофлуоресцентного фарбування	57
2.7. Конфокальна мікроскопія.....	59
2.8. Аналіз зображень.....	61
2.8.1. Програмне забезпечення.....	61
2.8.2. Сегментація клітин та детекція GLT-1	63
2.8.3. Параметри кількісного аналізу	65
2.9. Статистичний аналіз	66
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ.....	70
3.1. Загальні принципи аналізу та інтерпретації флуоресцентних даних	70
3.2. Верифікація моделі легкої черепно-мозкової травми	72
3.2.1. Відновлення рефлексу випрямлення.....	72
3.2.2. Гліоз як гістологічний маркер ефективності моделі	73
3.3. Базовий рівень та розподіл GLT-1 у контрольних групах	75
3.3.1. GLT-1 в астроцитах контрольної групи та групи контролю + цефтріаксон	75
3.3.2. GLT-1 у нейронах контрольної групи та групи контролю + цефтріаксон	78
3.4. Зміни GLT-1 в астроцитах після легкої черепно-мозкової травми та введення цефтріаксону	79
3.4.1. Морфологічні зміни астроцитів після лЧМТ	80
3.4.2. Кластеризація GLT-1 в астроцитах на 3-й день після лЧМТ	81
3.4.3. Динаміка GLT-1 в астроцитах на 7-й день після лЧМТ.....	84
3.4.4. Динаміка GLT-1 в астроцитах на 14-й день після лЧМТ.....	86

3.5. Зміни GLT-1 у пірамідних нейронах після легкої черепно-мозкової травми та введення цефтріаксону	90
3.5.1. Морфологія пірамідних нейронів після лЧМТ	90
3.5.2. Відносна площа GLT-1-кластерів у нейронах після лЧМТ	91
3.5.3. Відносна інтенсивність GLT-1-кластерів у нейронах після лЧМТ.....	93
3.5.4. Паралелізм між нейрональною та астроцитарною GLT-1 при лЧМТ ...	95
3.6. Порівняльний аналіз динаміки GLT-1 в астроцитах та нейронах.....	98
3.6.1. Загальна динаміка кластеризації GLT-1 після лЧМТ	98
3.6.2. Ефект цефтріаксону: спільне та відмінне для астроцитів та нейронів..	98
3.6.3. Часові профілі відповіді GLT-1 на лЧМТ та цефтріаксон	99
3.7. Запропонована модель механізму кластеризації GLT-1 після лЧМТ.....	100
3.7.1. Тригери кластеризації GLT-1 при лЧМТ.....	100
3.7.2. Додаткові механізми зниження ефективності GLT-1 при лЧМТ	102
3.7.3. Механізм дії цефтріаксону в контексті GLT-1-кластеризації	103
3.8. Методологічні обмеження та перспективи.....	105
3.8.1. Відсутність функціональних та поведінкових тестів	105
3.8.2. Специфічність антитіла та обмеження методу	106
3.8.3. Обмеження вибірки та стратегії аналізу	106
3.8.4. Перспективи подальших досліджень	107
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	109
4.1. Загальна оцінка отриманих результатів у контексті мети та завдань дослідження	109
4.2. Обговорення зміни рівня та кластеризації GLT-1 в астроцитах після лЧМТ	111

4.2.1. Зниження загального рівня GLT-1 в астроцитах: порівняння з літературою	112
4.2.2. Кластеризація GLT-1 в астроцитах як новий феномен при лЧМТ	113
4.2.3. Часовий профіль змін GLT-1 в астроцитах та ефект цефтріаксону	114
4.3. Обговорення змін GLT-1 у пірамідних нейронах після лЧМТ	115
4.3.1. Нейрональна GLT-1 у CA1 гіпокампу: новий погляд на «астроцитарний» транспортер	115
4.3.2. Кластеризація нейрональної GLT-1 після лЧМТ: механізми та значення	117
4.3.3. Відтермінований ефект цефтріаксону на нейрональну GLT-1	118
4.4. GLT-1-кластеризація	119
4.4.1. Аргументи на користь патологічної інтерпретації	120
4.4.2. Аргументи на користь адаптивної інтерпретації	120
4.4.3. Синтез: кластеризація як спочатку адаптивна, але прогресуюча у патологічну відповідь	121
4.5. Обговорення впливу цефтріаксону на GLT-1 при лЧМТ у порівнянні з літературою	123
4.5.1. Первинний механізм дії цефтріаксону: класична та нова точки зору .	123
4.5.2. Специфічність ефекту цефтріаксону щодо пошкоджених ділянок	124
4.5.3. Відсутність ефекту цефтріаксону на загальний рівень GLT-1 в астроцитах після лЧМТ	124
4.5.4. Оптимальний протокол введення цефтріаксону: дискусія	125
4.6. GLT-1 при лЧМТ у контексті інших нейрологічних патологій	127
4.6.1. GLT-1 при ішемічному інсульті: паралелі з лЧМТ	127
4.6.2. GLT-1 при нейродегенеративних захворюваннях	127

4.6.3. GLT-1 при психіатричних розладах, пов'язаних з лЧМТ	129
4.7. Порухення гематоенцефалічного бар'єру та його вплив на функцію GLT-1	129
4.7.1. Неексайтаторні амінокислоти як субстрати зворотного GLT-1-транспорту.....	130
4.7.2. Гіпоксичне мікросередовище та GLT-1	130
4.8. Нейрони та астроцити: різні ролі GLT-1 у посттравматичній нейропротекції	131
4.8.1. Глутаматний цикл і взаємодія нейрон–астроцит після лЧМТ	131
4.8.2. Реактивний астрогліоз та GLT-1: складний взаємозв'язок	133
4.8.3. Нейрональна GLT-1 як нова ціль терапії лЧМТ	134
4.9. Методологічні аспекти та ключові обмеження: розширена дискусія	135
4.9.1. Обмеження флуоресцентної мікроскопії для оцінки GLT-1	135
4.9.2. Обмеження, пов'язані зі специфічністю антитіла	135
4.9.3. Ліміти порогового аналізу Otsu	136
4.9.4. Відсутність функціональних вимірювань глутаматного транспорту ..	137
4.10. Значення результатів для розуміння патофізіології лЧМТ та розробки нейропротективних стратегій	139
4.10.1. Переосмислення «зниження GLT-1» при ЧМТ: від кількісної до просторової парадигми	139
4.10.2. Цефтріаксон у клінічному контексті.....	139
4.10.3. Гіпокамп та GLT-1 у контексті когнітивних наслідків лЧМТ	140
4.11. Наукова новизна та місце роботи у загальному контексті дослідження лЧМТ	141
4.12. Узагальнення та перспективи	143

ВИСНОВКИ	146
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	148

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АМФ — аденозинмонофосфат

АТФ — аденозинтрифосфат

ГЕБ — гематоенцефалічний бар'єр

ВРВ — втрата рефлексу випрямлення

ДПА — дифузне пошкодження аксонів

РВВ — час відновлення рефлексу випрямлення

КТ — комп'ютерна томографія

лЧМТ — легка черепно-мозкова травма

МРТ — магнітно-резонансна томографія

НАН — Національна академія наук

ФБ — фосфатний буфер

ПФ — параформальдегід

ЦНС — центральна нервова система

ЧМТ — черепно-мозкова травма

АМРА — α -аміно-3-гідрокси-5-метилізоксазол-4-пропіонова кислота

APP — amyloid precursor protein (білок-попередник амілоїду)

β -APP — beta-amyloid precursor protein

BBB — blood-brain barrier (гематоенцефалічний бар'єр)

BDNF — brain-derived neurotrophic factor

BSA — bovine serum albumin (бичача сироватка альбуміну)

CBF — cerebral blood flow (мозковий кровотік)

CDC — Centers for Disease Control and Prevention

СТЕ — chronic traumatic encephalopathy (хронічна травматична енцефалопатія)

DAI — diffuse axonal injury (дифузне пошкодження аксонів)

EAAT — excitatory amino acid transporter

EAAT2 — excitatory amino acid transporter 2 (= GLT-1 у гризунів)

FA — fractional anisotropy (фракційна анізотропія)

FoV — field of view (поле зору)

GCS — Glasgow Coma Scale (Шкала коми Глазго)

GFAP — glial fibrillary acidic protein (гліальний фібрилярний кислий білок)

GLT-1 — glutamate transporter-1 (астроцитарний глутаматний транспортер-1)

GLAST — glutamate-aspartate transporter (= EAAT1)

IFN- γ — interferon gamma

IL — interleukin (інтерлейкін)

IQR — interquartile range (міжквартильний розмах)

JNK — c-Jun N-terminal kinase

LTP — long-term potentiation (довготривала потенціація)

NeuN — neuronal nuclei (нейрональний ядерний антиген)

NF- κ B — nuclear factor kappa B

NGF — nerve growth factor

NMDA — N-метил-D-аспартат

ROS — reactive oxygen species (активні форми кисню)

SLC1 — solute carrier family 1 (родина переносників розчинних речовин)

TBI — traumatic brain injury (черепно-мозкова травма)

TGF- β — transforming growth factor beta

TNF- α — tumor necrosis factor alpha (фактор некрозу пухлини- α)

ВСТУП

Актуальність теми

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) є однією з провідних причин смерті та інвалідності серед людей молодого та середнього віку в усьому світі. Щороку реєструється понад 69 мільйонів нових випадків ЧМТ, понад 80% з яких становить легка форма [1, 2]. В умовах воєнного конфлікту в Україні проблема набуває особливої гостроти: бойові дії, і як наслідок, вибухові травми, транспортні пригоди та інші є головними чинниками зростання захворюваності. Однак реальна захворюваність значно перевищує офіційні показники, оскільки більшість постраждалих від лЧМТ не звертаються за медичною допомогою, а стандартні методи нейровізуалізації / діагностики (КТ, МРТ) часто не виявляють патологічних змін при легкій формі травми [3, 4, 5].

Незважаючи на позірну «легкість» симптомів, лЧМТ може призводити до стійких когнітивних порушень, емоційної нестабільності та підвищеного ризику розвитку нейродегенеративних захворювань — хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона та хронічної травматичної енцефалопатії (СТЕ) [1, 6, 7]. Зокрема, у ветеранів з бойовою лЧМТ виявлено значно вищу частоту психічних розладів та суїцидальних думок порівняно з особами без анамнезу ЧМТ [8, 9]. Серед спортсменів, що займаються контактними видами спорту, повторювані лЧМТ корелюють із прискореним розвитком СТЕ [10].

Одним із ключових механізмів вторинного ушкодження при лЧМТ є глутаматна ексайтотоксичність — патологічне накопичення збуджувального нейромедіатора глутамату в позаклітинному просторі внаслідок масового вивільнення з деполяризованих нейронів і недостатнього зворотного захоплення гліальними клітинами. Надлишковий глутамат активує іонотропні рецептори NMDA та AMPA, спричиняє патологічний вхід кальцію до нейронів, митохондріальну дисфункцію і зрештою відстрочену загибель нейронів [11].

Центральну роль у нейтралізації ексайтотоксичності відіграє глутаматний транспортер GLT-1 (EAAT2) — основний астроцитарний переносник глутамату, що забезпечує 80–90% його зворотного захоплення у мозку ссавців [12]. Показано, що рівень GLT-1 знижується у мозку після ЧМТ, особливо виражено на 7-й день після травми [13, 14, 15]. Проте досі залишалось невідомим, чи зазнає GLT-1 не лише кількісних змін, а й просторового перерозподілу у межах клітини — зокрема, чи відбувається його патологічна кластеризація, аналогічна до тієї, що описана при довготривалій потенціації.

Наша попередня робота [16] та публікований нами огляд патофізіології лЧМТ [17] окреслили зазначену прогалину у знаннях. Теперішня дисертація є першим систематичним дослідженням змін просторового розподілу GLT-1 (кластеризації транспортера) як у астроцитах, так і в нейронах CA1 зони гіпокампу після лЧМТ, а також вперше оцінює вплив цефтріаксону — відомого індуктора GLT-1 — на ці процеси.

Зв'язок роботи з науковими програмами

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: гранту НАН України (реєстраційний номер 0124U001556).

Мета і завдання дослідження

Мета роботи: дослідити зміни розподілу та рівня експресії глутаматного транспортера GLT-1 в астроцитах і пірамідних нейронах CA1 зони гіпокампу мишей після легкої дифузної черепно-мозкової травми та оцінити вплив цефтріаксону на ці зміни.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Охарактеризувати базовий розподіл і рівень GLT-1 в астроцитах і нейронах CA1 зони гіпокампу у контрольних тварин та у тварин, яким вводили цефтріаксон без травматизації.
2. Дослідити динаміку кластеризації та загального рівня GLT-1 в астроцитах на 3-й, 7-й та 14-й день після лЧМТ.
3. Дослідити зміни площі розподілу та відносної інтенсивності флуоресценції GLT-1 у сомах пірамідних нейронів після лЧМТ.
4. Оцінити вплив цефтріаксону (250 мг/кг, 5 діб) на розподіл та рівень GLT-1 в астроцитах і нейронах гіпокампу на різних часових точках після лЧМТ.
5. Запропонувати модель механізму впливу GLT-1-кластеризації на посттравматичну ексайтотоксичність та роль цефтріаксону в її корекції.

Об'єкт і предмет дослідження

Об'єкт дослідження: гіпокамп мишей після легкої дифузної черепно-мозкової травми.

Предмет дослідження: розподіл і рівень глутаматного транспортера GLT-1 в астроцитах та пірамідних нейронах зони CA1 гіпокампу, а також вплив цефтріаксону на ці параметри.

Методи дослідження

У роботі використано: модифіковану модель легкої дифузної ЧМТ (Marmarou weight-drop); оцінка відновлення рефлексу випрямлення; транскардіальна перфузія мишей; отримання зрізів мозку на вібраторі; тришарове флуоресцентне імуногістохімічне фарбування антитілами до NeuN, GFAP, GLT-1; конфокальну лазерну скануючу мікроскопію; напівавтоматичний аналіз зображень за допомогою авторського плагіна для Napari (Python); непараметричні методи

статистичного аналізу (тест Вілкоксона–Манна–Уїтні, тест Краскела–Уолліса, парний тест Вілкоксона з поправкою на множинні порівняння).

Вибір тварин для експерименту базувався на принципі мінімізації біологічної варіабельності при збереженні клінічної релевантності моделі. Використання лише самців зумовлено необхідністю уникнення впливу естрогенового циклу на нейрозапалення та нейропротекцію, оскільки естрогени мають доведений нейропротективний ефект при ЧМТ, що може маскувати ефект цефтріаксону. Вікові обмеження (8–12 тижнів) забезпечують використання молодих дорослих тварин із завершеним розвитком мозку, але без вікових змін, які можуть впливати на нейропластичність та відповідь на травму. Масові обмеження (25–30 г) є критичними для стандартизації біомеханічних параметрів weight-drop моделі, оскільки маса тварини впливає на розподіл кінетичної енергії удару та, відповідно, на тяжкість травми.

Утримання тварин відповідало стандартним умовам віварію: температура $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, відносна вологість $50\pm 10\%$, 12-годинний цикл світло/темрява із початком світлового періоду о 7:00. Тварини мали вільний доступ до стандартного корму та води. Адаптаційний період тривав щонайменше 7 днів перед початком експериментальних маніпуляцій для мінімізації стресового фактору від зміни середовища. Рандомізація тварин у експериментальні групи проводилась за допомогою генератора випадкових чисел, що забезпечувало неупереджений розподіл. Розмір кожної експериментальної групи ($n=6-8$) визначався на основі попередніх пілотних досліджень та аналізу потужності з урахуванням очікуваного розміру ефекту та бажаного рівня значущості.

Для редагування та граматичної перевірки тексту дисертації використано велику мовну модель Claude (Anthropic, версія Claude Sonnet 4, 2025). Модель застосовувалась як допоміжний інструмент для виявлення граматичних, синтаксичних та стилістичних помилок в україномовному тексті, перевірки узгодженості термінології та покращення загальної читабельності наукового тексту. Усі запропоновані моделлю зміни переглядались та затверджувались

автором вручну. Змістовна частина дисертації, включаючи наукові положення, інтерпретацію результатів та висновки, є виключно результатом самостійної роботи автора.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше показано, що легка ЧМТ індукує кластеризацію GLT-1 як в астроцитах, так і в соматичному відділі пірамідних нейронів CA1 зони гіпокампу мишей.

Вперше продемонстровано, що цефтріаксон пригнічує посттравматичну кластеризацію GLT-1 і сприяє відновленню його рівномірного розподілу в обох типах клітин.

Вперше виявлено GLT-1 на сомах пірамідних нейронів у *Stratum Pyramidale* CA1 зони гіпокампу в умовах лЧМТ.

Запропоновано концепцію, згідно з якою перерозподіл (кластеризація), а не лише зниження рівня GLT-1, є ключовим патологічним механізмом недостатнього зворотного захоплення глутамату після лЧМТ.

Практичне значення одержаних результатів

Отримані результати обґрунтовують доцільність дослідження цефтріаксону як нейропротективного агента при лЧМТ з акцентом на його здатності нормалізувати просторову організацію GLT-1. Дані є основою для розробки доклінічних протоколів терапії посттравматичної ексайтотоксичності та для впровадження нових критеріїв оцінки ефективності нейропротективних стратегій, що враховують розподіл, а не лише рівень транспортера.

Особистий внесок здобувача

Дисертантка особисто виконала весь обсяг експериментальних досліджень: нанесення лЧМТ, введення цефтріаксону, підготовку зрізів мозку, імуногістохімічне фарбування, збір конфокальних зображень, розробку та застосування програмного забезпечення для аналізу зображень, статистичний аналіз даних. Концепцію дослідження розроблено разом із науковим керівником д.б.н. Т.А. Півневою. Інтерпретація результатів та написання публікацій здійснені дисертантом за участю співавторів.

Апробація результатів дисертації

Основні результати дисертаційної роботи представлені та обговорені на таких наукових конференціях:

1. Naumenko, Y., Olifirov, B., Voitenko, N. and Pivneva, T. (2022) ‘Application of the ceftriaxone changes the GLT-1 distribution after traumatic brain injury’, 13th FENS Forum of Neuroscience, 9–13 July 2022, Abstract No. 3781.

<https://www.researchgate.net/publication/362850302>

2. Наumenko, Я., Оліфіров, Б., Войтенко, Н. і Півнева, Т. (2022) ‘Застосування цефтріаксону впливає на розподіл GLT-1 після легкої черепно-мозкової травми’, Всеукраїнська конференція з нейронаук з міжнародною участю, Київ, Україна, 25–27 липня 2022. Фізіологічний журнал, 68(3S). doi: 10.15407/fz68.03S.001 https://fz.kiev.ua/journals/2022_V.68/3S/2022-68-3S.pdf

3. Naumenko, Y. and Pivneva, T. (2023) ‘The use of ceftriaxone improves the structure of the hippocampal CA1 area and reduces behavioral problems in mice with mild brain injuries’, XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна, 18–19 травня 2023. Біологія тварин, 25(2). doi: 10.15407/animbiol25.02

<https://doi.org/10.15407/fz68.03S.001>

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 2 статті у наукових виданнях, що індексуються у наукометричних базах Scopus та Web of Science:

1. Naumenko, Y., Yuryshinets, I., Zabenko, Y. and Pivneva, T. (2023) 'Mild traumatic brain injury as a pathological process', Heliyon, 9(7), e18342. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18342 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18342>

2. Naumenko, Ya., Olifirov, B., Yuryshynets, I. and Pivneva, T. (2026) 'Ceftriaxone has a similar effect on astrocytic and neuronal GLT-1 distribution after mild traumatic brain injury', Biochemical and Biophysical Research Communications, 822, 153895. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2026.153895>

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг роботи становить 160 сторінок, з них 135 сторінок основного тексту. Роботу ілюстровано 5 рисунками та 4 таблицями. Список використаних джерел містить 136 найменувань.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Черепно-мозкова травма: визначення, епідеміологія та класифікація

1.1.1. Визначення та загальна характеристика

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) визначається як порушення нормальної функції мозку, спричинене зовнішньою механічною силою — зіткненням, поштовхом, струсом або проникаючим пораненням голови (Centers for Disease Control and Prevention, 2016). Мозок людини є складним механізмом, у якому безперервно взаємодіє велика кількість клітинних типів — нейрони, астроцити, мікроглія, олігодендроцити та клітини еpendyma. Навіть незначні ушкодження запускають каскад молекулярних подій із серйозними наслідками [2, 3, 4].

Патогенез ЧМТ передбачає кардинальні зміни у фізіологічній взаємодії клітин мозку та молекулярному гомеостазі. Первинні ушкодження є прямим результатом механічного впливу: лінійних та обертальних сил прискорення та уповільнення, тиск-хвиль вибуху тощо. Такі впливи пошкоджують тіла нейронів, аксони, дендрити, гліальні клітини та судини [3]. За ступенем тяжкості ЧМТ варіює від незначних змін свідомості до коматозного стану та смерті [4].

Молекулярні механізми первинного ушкодження при лЧМТ включають кілька паралельних каскадів, кожен з яких має свою часову динаміку та специфічні молекулярні мішені. Механопорація — утворення транзиторних пор у клітинних мембранах внаслідок механічного розтягнення — є найбільш раннім молекулярним наслідком травми, що виникає протягом мілісекунд. Через ці пори відбувається неконтрольований рух іонів (вхід кальцію та натрію, вихід калію) та малих молекул, включаючи глутамат. Розмір та тривалість існування пор залежить від сили механічного впливу: при лЧМТ пори є переважно транзиторними і закриваються протягом хвилин-годин, на відміну від тяжкої ЧМТ, де мембранне ушкодження може бути незворотним. Проте навіть транзиторна механопорація достатня для запуску патологічних каскадів, зокрема кальцій-залежної

протеолітичної деградації цитоскелетних білків (спектрину, MAP2, тау-білка) та активації кальпаїнів.

Іонний дисбаланс, що виникає внаслідок механопорації, запускає компенсаторну активацію іонних pomp (Na^+/K^+ -АТФази, Ca^{2+} -АТФази, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника), яка споживає значну кількість АТФ. Одночасно механічне ушкодження мітохондрій знижує продукцію АТФ, створюючи «енергетичну кризу» — стан, при якому потреба в енергії перевищує можливості її продукції. Ця криза є центральним патогенетичним механізмом лЧМТ, оскільки від достатності АТФ залежить функціонування глутаматних транспортерів, зокрема GLT-1, який є вторинно-активним транспортером і залежить від натрієвого градієнту, що підтримується Na^+/K^+ -АТФазою. Таким чином, вже на найбільш ранніх етапах після лЧМТ створюються умови для порушення глутаматного гомеостазу — центрального предмету нашого дослідження.

Вторинне ушкодження розгортається протягом годин-тижнів після первинної травми і включає нейрозапалення, оксидативний стрес, порушення гематоенцефалічного бар'єру, набряк мозку, аксональну дегенерацію та апоптоз. Нейрозапалення при лЧМТ ініціюється активацією мікроглії та астроцитів, які вивільняють прозапальні цитокіни ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6), хемокіни та активні форми кисню. Ці молекули мають подвійну роль: з одного боку, вони необхідні для видалення пошкоджених клітин та ініціації репаративних процесів; з іншого — надмірне або тривале запалення поглиблює ушкодження здорової тканини. Оксидативний стрес, що виникає внаслідок порушення мітохондріальної функції та активації NADPH-оксидази мікроглії, додатково ушкоджує мембранні ліпіди, білки та ДНК, що може безпосередньо впливати на структуру та функцію GLT-1 через оксидативну модифікацію його цистеїнових залишків.

Легка ЧМТ (лЧМТ) визначається через один або більше з таких критеріїв: будь-який епізод втрати свідомості тривалістю до 30 хвилин, ретроградна або антероградна амнезія, зміни психічного стану на момент травми (дезорієнтація, розгубленість), або транзиторний фокальний неврологічний дефіцит. За Шкалою

коми Глазго (GCS) пацієнти з лЧМТ отримують 13–15 балів [7, 18]. У більшості наукових джерел поняття лЧМТ є взаємозамінним з поняттям «струс мозку», хоча між ними існують концептуальні відмінності: струс — клінічний синдром, що може перекривати легкий, середній та тяжкий ступені, тоді як лЧМТ визначається саме на основі GCS [19].

Слід зазначити, що діагностика лЧМТ залишається складною клінічною проблемою, оскільки більшість діагностичних критеріїв базуються на суб'єктивних симптомах та клінічних спостереженнях. На відміну від середньої та тяжкої ЧМТ, де структурні ушкодження зазвичай візуалізуються на КТ або МРТ, лЧМТ часто не супроводжується видимими макроскопічними ураженнями мозкової тканини. Це створює парадоксальну ситуацію: травма, яка за визначенням є «легкою», може спричиняти тривалі та клінічно значущі наслідки, що суттєво впливають на якість життя пацієнтів.

Окремою проблемою є диференціальна діагностика лЧМТ із іншими станами, що мають подібну клінічну картину. Посттравматичний стресовий розлад, цервікогенні головні болі, вестибулярні порушення та психогенні розлади можуть імітувати або посилювати симптоми лЧМТ, ускладнюючи оцінку справжнього внеску травматичного ушкодження мозку в клінічну картину. Саме тому сучасні рекомендації наголошують на необхідності мультидисциплінарного підходу до діагностики та лікування лЧМТ, із залученням неврологів, нейропсихологів, реабілітологів та інших фахівців.

З молекулярної точки зору, навіть при відсутності макроскопічних ушкоджень, лЧМТ запускає каскад нейрохімічних та нейрометаболічних змін, що можуть тривати від годин до тижнів і місяців після травми. Ці зміни включають порушення іонного гомеостазу, ексайтотоксичність, нейрозапалення, оксидативний стрес та порушення аксонального транспорту. Розуміння цих молекулярних механізмів є ключовим для розробки ефективних терапевтичних стратегій, спрямованих на запобігання вторинному ушкодженню мозку після лЧМТ.

1.1.2. Епідеміологія

ЧМТ є однією з провідних причин смертності та інвалідності у всьому світі. Щороку реєструється понад 69 мільйонів нових випадків ЧМТ, причому понад 80% з них — легка форма [20]. У країнах ЄС щороку фіксується щонайменше 2,5 мільйони випадків, у США — близько 3,5 мільйони [21, 22].

Реальна захворюваність значно вища за офіційні показники, оскільки більшість постраждалих від лЧМТ не звертаються по медичну допомогу. Справжня річна захворюваність на лЧМТ, за оцінками, перевищує 600 на 100 000 населення, що становить близько 42 мільйонів людей щороку в усьому світі [23, 24].

Ключовою змінною для оцінки ризику є вік: найвищі показники ЧМТ у відділеннях невідкладної допомоги зафіксовані у вікових групах 0–4 роки (1618,6 на 100 000) та 75 і більше (1682 на 100 000) через поширеність падінь у цих вікових категоріях [22]. Серед молоді до 25 років понад 30% мали хоча б одну ЧМТ, що потребувала медичної допомоги [25].

Існують гендерні відмінності: за даними американської національної бази TBI Model System, чоловіки отримують понад 73% усіх зареєстрованих ЧМТ. Проте в спортивних ЧМТ жінки перевищують чоловіків у співвідношенні приблизно 2:1 [26, 22]. Особливу групу ризику становлять військовослужбовці: бойова лЧМТ є провідною причиною захворюваності та смертності, нерідко поєднуючись із вибуховою травмою та позачерепними ушкодженнями, нетиповими для цивільних випадків [9, 27].

Епідеміологічні дані щодо лЧМТ мають суттєві обмеження, пов'язані з неоднорідністю визначень та діагностичних критеріїв у різних країнах і медичних системах. Відсутність єдиного стандартизованого підходу до реєстрації випадків лЧМТ призводить до значних розбіжностей в оцінках захворюваності між різними дослідженнями та регіонами. Крім того, значна частина випадків лЧМТ, особливо тих, що виникають унаслідок побутових травм або спортивних інцидентів, залишається незареєстрованою через відсутність звернення постраждалих за медичною допомогою.

Особливу увагу привертає проблема повторних лЧМТ, яка набула актуальності у контексті контактних видів спорту та військових конфліктів. Кумулятивний ефект повторних лЧМТ може призводити до хронічної травматичної енцефалопатії — прогресуючого нейродегенеративного захворювання, що характеризується накопиченням тау-білка та поступовою атрофією мозку. Це підкреслює важливість розуміння молекулярних механізмів навіть поодинокі лЧМТ для розробки стратегій профілактики довготривалих наслідків.

Економічний тягар ЧМТ є значним і включає як прямі витрати на медичне обслуговування, так і непрямі витрати, пов'язані зі зниженням продуктивності праці та тривалою реабілітацією. За оцінками, щорічні витрати на лікування ЧМТ у Сполучених Штатах перевищують 76 мільярдів доларів, причому значна частка цих витрат припадає саме на лЧМТ через її високу поширеність. У контексті військових конфліктів лЧМТ є однією з найпоширеніших бойових травм, що зумовлює значні витрати систем охорони здоров'я та соціального забезпечення.

1.1.3. Класифікація

ЧМТ класифікується за кількома критеріями. Найбільш поширена — класифікація за ступенем тяжкості на основі GCS: легка (13–15 балів), середня (9–12 балів) та тяжка (≤ 8 балів). Однак адекватна характеристика ЧМТ вимагає врахування кількох вимірів: клінічних та патофізіологічних ознак, даних нейровізуалізації та інших факторів, що впливають на клінічний результат [6].

За механізмом ушкодження ЧМТ поділяється на закриті та проникаючі: перші є наслідком прискорення–уповільнення (характерна модель для лЧМТ), другі — механічного порушення цілісності черепа. Закриті травми частіше призводять до дифузного аксонального ушкодження та субдуральних гематом, проникаючі — до епідуральних гематом і контузій [6]. За типом патоанатомічних змін виокремлюють вогнищеві (переважно контактний механізм) та дифузні (прискорення–уповільнення) ушкодження.

Шкала Marshall (1992) — перша класифікація на основі КТ — визначає зв'язок між патерном КТ-аномалій та внутрішньочерепним тиском [28]. Її обмеженням є неможливість оцінки підтипів уражень та одновимірність. Пізніша Rotterdam-шкала дозволяє роздільно оцінювати компоненти КТ-даних і визначає прогностичну цінність клінічних ознак [29]. Шкала FOUR, розроблена для подолання обмежень GCS, дозволяє оцінювати стан стовбура мозку та пацієнтів на ШВЛ [30].

Класифікація ЧМТ за ступенем тяжкості на основі GCS, попри свою широку поширеність, має суттєві обмеження при застосуванні до лЧМТ. Оцінка 13–15 балів за GCS охоплює широкий спектр клінічних станів — від мінімальних симптомів до значних когнітивних порушень. Це зумовило появу пропозицій щодо субкласифікації лЧМТ на «ускладнену» (з ознаками на нейровізуалізації) та «неускладнену» (без видимих змін). Шкала FOUR (Full Outline of UnResponsiveness), запропонована Wijdicks et al. (2005), є більш деталізованою альтернативою GCS, що враховує стовбурові рефлекси та дихання, проте її застосування для лЧМТ також обмежене [30].

Класифікація за патоанатомічним типом ушкодження поділяє ЧМТ на вогнищеві (контузії, гематоми, лакунарні ушкодження) та дифузні (дифузне пошкодження аксонів, дифузний набряк мозку). У контексті лЧМТ переважає дифузний тип ушкодження, що відображає біомеханіку закритої травми з прискоренням-уповільненням. Саме цей тип ушкодження відтворює наша модель weight-drop, що забезпечує клінічну релевантність отриманих результатів.

1.2. Біомеханіка легкої черепно-мозкової травми

До механізмів лЧМТ належать прямий удар, сила інерції та вибухова надлишкова тиск-хвиля. Найпоширеніші в цивільному житті причини — заняття спортом та дорожньо-транспортні пригоди — зазвичай є наслідком удару по голові, що призводить до різкого прискорення або уповільнення. Деформації при цьому

передаються від зовнішніх до внутрішніх ділянок мозку, спричиняючи дифузне розподілену патологію [31].

Хоча роль лінійного прискорення у первинному ушкодженні при лЧМТ відома вже давно, сучасні дослідження свідчать, що кутове прискорення значно шкідливіше для мозкової тканини. Показано, що 90% загальних деформацій у мозку під час прискорення голови спричинені ротаційним компонентом і лише 10% — трансляційним [32]. Вибухова надлишкова тиск-хвиля, актуальна в умовах збройного конфлікту, поширюється як сферична хвиля через взаємодію форми черепа і однорідності щільності мозкової тканини, фокусуючи енергію у глибинних структурах [33].

Ключовими кінематичними параметрами, що визначають тяжкість дифузного ЧМТ, є пікове кутове прискорення, швидкість обертання та тривалість прискорення [34]. Особливого значення для трансляційних досліджень набуває масштабування результатів з тварин на людину — з урахуванням відмінностей у розмірах і структурних властивостях черепа та мозку гризунів, приматів і людини.

Розуміння біомеханіки лЧМТ має принципове значення для розробки адекватних тваринних моделей. Модель, використана в нашому дослідженні (weight-drop за Marmarou), відтворює саме дифузну закриту ЧМТ, що є найбільш поширеним типом лЧМТ у цивільних умовах. У цій моделі вантаж, що падає на тім'яну ділянку черепа, створює переважно лінійне прискорення з компонентом кутового прискорення, що виникає внаслідок обертального руху голови навколо шийного відділу хребта. Амортизована платформа, на якій розміщена тварина, забезпечує контрольовану дисипацію енергії удару та запобігає надмірному ушкодженню.

Важливим аспектом біомеханіки лЧМТ є гетерогенність розподілу механічних напружень у мозковій тканині. Комп'ютерне моделювання методом скінченних елементів показало, що при дифузній ЧМТ максимальні зсувні деформації виникають у глибинних структурах мозку, зокрема в мозолистому тілі та гіпокампі, а не лише в кортикальних шарах, безпосередньо прилеглих до місця

удару. Це пояснює, чому гіпокамп — структура, розташована на значній відстані від тім'яної ділянки кори — демонструє значну вразливість при лЧМТ і є обґрунтованим об'єктом для вивчення молекулярних наслідків травми.

Швидкість деформації мозкової тканини є не менш важливим параметром, ніж амплітуда деформації. Мозкова тканина є в'язкопружним матеріалом, і її механічна відповідь залежить від швидкості навантаження. При високих швидкостях деформації, характерних для лЧМТ, мозкова тканина поводить себе як більш жорсткий матеріал, що призводить до більших напружень та підвищеного ризику мікроструктурних ушкоджень на клітинному рівні, включаючи механопорацію клітинних мембран та розтягнення аксонів.

Роль позаклітинного матриксу (ПКМ) у передачі механічних сил до клітин мозку при лЧМТ є недостатньо вивченою, але має потенційне значення для розуміння механізмів кластеризації GLT-1. ПКМ мозку, на відміну від інших тканин, має унікальний склад із переважанням гіалуронової кислоти, тенасцину та хондроїтинсульфатних протеогліканів замість колагенів та фібронектину. Перинейрональні сітки — спеціалізовані структури ПКМ, що оточують тіла та проксимальні дендрити окремих нейронів — можуть модулювати передачу механічного стресу на нейрональну мембрану та впливати на розподіл мембранних білків, включаючи GLT-1. Ушкодження перинейрональних сіток при лЧМТ, задокументоване кількома дослідженнями, може дестабілізувати мембранну організацію GLT-1 та сприяти його кластеризації.

1.3. Патофізіологія легкої черепно-мозкової травми

1.3.1. Первинне ушкодження та порушення клітинного гомеостазу

Механічна сила, що прикладається до мозку під час травми, порушує клітинний гомеостаз і запускає складний каскад нейрохімічних та нейрометаболических змін. Зсувні та розтягуючі сили спричиняють механопорацію клітинних мембран, результатом якої є некерований вихід внутрішньоклітинного

калію і подальша деполяризація [35]. Ця швидка деполяризація відкриває потенціал-залежні кальцієві канали та ініціює синаптичне вивільнення переважно збуджувальних нейромедіаторів, зокрема глутамату.

Дослідження методами мікродіалізу та протонної магнітно-резонансної спектроскопії виявили, що зміни концентрації нейромедіаторів є регіон- та часо-специфічними. Безпосередньо після лЧМТ концентрація глутамату в мозку різко підвищується і повертається до норми протягом годин. Підвищений рівень позаклітинного глутамату корелює з тяжкістю ушкодження та складністю наслідків [36].

Глутамат зв'язується з рецепторами NMDA, AMPA та кайнатними, що посилює вихід калію і створює петлю позитивного зворотного зв'язку — деполяризацію і гіперзбудливість. Вивільнення збуджувальних нейромедіаторів стимулює внутрішньоклітинний приплив натрію та кальцію, що призводить до деградації клітинних і мітохондріальних структур [11, 35]. Мутації у генах *CACNA1A* та *CACNA1E* (що кодують потенціал-залежні кальцієві канали) пов'язані з підвищеною тяжкістю посттравматичних наслідків у спортсменів.

1.3.2. Оксидативний стрес при лЧМТ

Одним із ключових компонентів ушкодження клітин та тканин при ЧМТ є оксидативний стрес — дисбаланс між продукцією активних форм кисню (ROS) та їх нейтралізацією антиоксидантними системами [37]. У нормі ROS продукуються у мозку для участі у таких процесах, як синаптична пластичність і формування пам'яті [38]. Однак при патологічному вивільненні вони спричиняють дифузне ушкодження аксонів [39] та підвищену нейрональну вразливість до ексайтотоксичності.

Після активації глутаматних рецепторів підвищується внутрішньоклітинний кальцій, що активує мітохондрії та ферменти — джерела ROS (супероксиди, пероксид водню, оксид азоту, пероксинітрит) [37, 40]. Нервова тканина особливо чутлива до пошкодження вільними радикалами через велику кількість

поліненасичених ліпідів у мембранах. Астроцити та мікроглія у підсумку не справляються з елімінацією вільних радикалів, що призводить до їх активації.

1.3.3. Метаболічні зміни та мітохондріальна дисфункція

АТР-залежні Na/K-насоси після лЧМТ активуються максимально, намагаючись відновити іонну рівновагу, що призводить до швидкого виснаження внутрішньоклітинних резервів глюкози. Нейрональна гліколіза зростає на 30–46% протягом 30 хвилин після удару та може тривати 4–6 годин. Водночас цей гіперметаболічний період супроводжується гіпометаболізмом глюкози (5–10 днів після ЧМТ), неефективним окисним метаболізмом та зниженим мозковим кровотоком [41, 11, 42].

Основною причиною мітохондріальної дисфункції після лЧМТ є приплив і накопичення кальцію через потенціал-залежні кальцієві канали та NMDA-рецептори [11]. Ці зміни гомеостазу кальцію відображаються у зниженні метаболічних біомаркерів: співвідношень АТФ/АДФ, НАД/НАДН, а також N-ацетиласпартату. Повторна ЧМТ у межах вікна метаболічної вразливості пов'язана з більш вираженими когнітивними порушеннями в тваринних моделях — це явище лягло в основу теорії «синдрому другого удару» [43].

Метаболічний стрес після лЧМТ має чітко виражену часову динаміку, яку можна поділити на кілька фаз. У перші хвилини та години після травми спостерігається гіперметаболізм, зумовлений спробами клітин відновити іонну рівновагу за допомогою АТФ-залежних насосів. Ця фаза змінюється тривалим гіпометаболізмом, що може зберігатися протягом днів і навіть тижнів. Перехід від гіпер- до гіпометаболізму корелює із виснаженням енергетичних резервів клітин та порушенням мітохондріальної функції.

Мітохондріальна дисфункція після лЧМТ не обмежується лише зниженням продукції АТФ. Порушення цілісності мітохондріальних мембран призводить до вивільнення цитохрому С та інших проапоптотичних факторів, що запускає каскад програмованої клітинної загибелі. Цей процес є особливо актуальним для нейронів, які мають високу залежність від окислювального фосфорилювання та обмежену

здатність до гліколітичного метаболізму. В астроцитах мітохондріальна дисфункція порушує глутамат-глутамінову конверсію, що є важливим етапом рециркулювання глутамату та підтримки його гомеостазу.

Мітохондріальна динаміка — баланс між поділом (fission) та злиттям (fusion) мітохондрій — є ще одним аспектом, що зв'язує енергетичний метаболізм із функцією GLT-1 при лЧМТ. Після травми спостерігається зміщення балансу в бік поділу мітохондрій (через активацію DRP1 — dynamin-related protein 1), що призводить до фрагментації мітохондріальної мережі та зниження ефективності окисного фосфорилювання. У астроцитах мітохондрії розташовані стратегічно — поблизу місць активного транспорту глутамату, забезпечуючи локальне постачання АТФ для підтримки іонних градієнтів. Фрагментація мітохондріальної мережі може порушити це просторове узгодження, створюючи локальний енергетичний дефіцит саме в тих ділянках мембрани, де GLT-1 найбільш активний, та сприяти його інтерналізації або кластеризації.

1.3.4. Дифузне пошкодження аксонів

Дифузне пошкодження аксонів (ДПА) є одним із найтяжчих наслідків ЧМТ будь-якого ступеня [44, 45, 46, 47]. Хоча тривалий час вважалося, що ДПА характерне лише для тяжкої та середньої ЧМТ, встановлено, що ураження білої речовини є суттєвим і при лЧМТ і може бути виявлене за набряком аксональних закінчень [48]. Первинні зміни при ДПА — порушення проникності аксолеми внаслідок фокальної механопорації, що забезпечує шлях внутрішньоаксонального надходження кальцію, активацію кальпаїну та структурні порушення цитоскелету аксонів [49, 50].

Ці порушення призводять до розладу як антероградного, так і ретроградного транспорту вздовж аксона та накопичення β -APP. Кінази JNK опосередковують порушення аксонального транспорту шляхом фосфорилювання важких ланцюгів кінезину-1. Незважаючи на те, що ДПА не асоціюється з довготривалими наслідками безпосередньо [51], воно є важливим пусковим чинником для відстроченої загибелі нейронів і нейродегенерації.

Дифузне пошкодження аксонів при лЧМТ має особливе значення для функціональної організації нейронних мереж гіпокампу. Аксональні зв'язки між зоною СА3 та СА1 (шаферові колатералі), а також між епітаринальною корою та зубчастою звивиною (перфорантний шлях) є критичними для функціонування гіпокампальної формації та процесів навчання і пам'яті. Порушення цілісності цих аксональних шляхів, навіть без загибелі нейронів, може спричиняти значні когнітивні дефіцити.

Взаємозв'язок між дифузним аксональним пошкодженням та функцією GLT-1 може реалізуватися через кілька механізмів. По-перше, пошкоджені аксони вивільняють глутамат та інші збуджуючі нейромедіатори, що підвищує навантаження на систему глутаматного кліренсу та може перевантажувати GLT-1. По-друге, валлерівська дегенерація пошкоджених аксонів активує мікроглію та астроцити в ділянках проходження пошкоджених трактів, що може вторинно впливати на GLT-1 через нейрозапальні механізми. По-третє, порушення аксонального транспорту може впливати на доставку білків-партнерів GLT-1 та регуляторних молекул до пресинаптичних терміналей, де нейрональна GLT-1 виконує свою функцію. Ці непрямі ефекти аксонального пошкодження на GLT-1 можуть пояснити, чому навіть при переважно дифузному характері лЧМТ зміни GLT-1 мають виражену регіональну специфіку.

Сучасні методи нейровізуалізації, зокрема дифузно-тензорна томографія, дозволяють виявляти субклінічні ушкодження білої речовини, що не візуалізуються на стандартних КТ та МРТ. Зниження фракційної анізотропії в трактах білої речовини є чутливим маркером мікроструктурних ушкоджень аксонів при лЧМТ. Ці зміни можуть зберігатися протягом місяців після травми та корелюють із когнітивними порушеннями, що підкреслює клінічну значущість ДПА навіть при легких формах ЧМТ.

1.4. Нейрозапалення та реакція гліальних клітин при лЧМТ

1.4.1. Астроцити

Астроцити взаємодіють із судинами, нейронами та іншими астроцитами через нейромедіаторну сигналізацію. Однією з їх ключових функцій є поглинання нейромедіаторів, що вивільняються з нервових закінчень [52]. Після ЧМТ астроцити переходять у реактивний стан: збільшуються у розмірах, посилюють галуження відростків та підвищують експресію GFAP — маркера реактивного астрогліозу, що розглядається як потенційний біомаркер лЧМТ у крові та спинномозковій рідині [53, 54].

Молекулярні механізми реактивного астрогліозу після лЧМТ включають активацію кількох сигнальних шляхів, серед яких центральне місце займають JAK/STAT3, NF- κ B та Notch. Шлях JAK/STAT3 активується цитокінами (IL-6, LIF, CNTF), що вивільняються пошкодженими нейронами та мікроглією, і є головним індуктором GFAP та віментину — маркерних білків реактивних астроцитів. Активація NF- κ B в астроцитах стимулює експресію прозапальних медіаторів, але одночасно підвищує транскрипцію GLT-1 через NF- κ B-респонсивні елементи промотора гена SLC1A2. Ця подвійна роль NF- κ B — проіндукція запалення та підтримка GLT-1 — створює складну регуляторну динаміку, де кінцевий ефект залежить від балансу між цими процесами.

Класифікація реактивних астроцитів на нейротоксичний фенотип A1 та нейропротективний фенотип A2, запропонована Liddelow et al. (2017), має особливе значення для розуміння регуляції GLT-1 при лЧМТ. Астроцити фенотипу A1, індуковані мікрогліальними цитокінами TNF- α , IL-1 α та C1q, характеризуються зниженою експресією нейротрофічних факторів та зниженням експресії GLT-1. Навпаки, астроцити фенотипу A2, індуковані ішемією та поміркованим запаленням, підвищують експресію нейропротективних генів, включаючи GLT-1. При лЧМТ спостерігається змішана популяція A1/A2 астроцитів, що може пояснювати гетерогенність змін GLT-1 у різних ділянках гіпокампу. Сучасні дослідження вказують на те, що поділ на A1/A2 є надмірно

спрощеним, і реальний спектр астроцитарних фенотипів при нейротравмі є значно ширшим.

Реактивний астрогліоз виконує подвійну роль. З одного боку, астроцити мігрують до ділянки ушкодження та формують гліальний рубець, що обмежує поширення некротичного процесу. З іншого боку, щільна астроцитарна перегородка інгібує регенерацію аксонів [55, 56]. Крім того, активовані астроцити продукують нейротрофічні фактори (NGF, еритропоетин), що мають нейропротективне значення [57].

Біосинтез та мембранний трафікінг GLT-1 є складним багатоетапним процесом, порушення якого може лежати в основі патологічної кластеризації, виявленої в нашому дослідженні. Після трансляції на рибосомах ендоплазматичного ретикулуму GLT-1 проходить N-глікозилювання та фолдинг, після чого тримеризується в апараті Гольджі. Правильна тримеризація є необхідною для виходу з ендоплазматичного ретикулуму — мономерні форми утримуються механізмами контролю якості. Тримерний GLT-1 транспортується до плазматичної мембрани у везикулах, рух яких забезпечується моторними білками (кінезинами) по мікротрубочках. На мембрані GLT-1 стабілізується взаємодіями з PDZ-доменними білками (PSD-95, PICK1), анкіринами та спектрином, що забезпечують його рівномірний розподіл.

Ендоцитоз та рециклінг GLT-1 є ключовими механізмами регуляції його мембранної щільності. Базальний рівень ендоцитозу забезпечує постійне оновлення мембранного пулу GLT-1, з періодом напівжиття на мембрані приблизно 6–12 годин у нормальних умовах. Ендоцитоз GLT-1 може бути клатрин-залежним та клатрин-незалежним, причому кожен шлях активується різними стимулами. Посттрансляційні модифікації — фосфорилування, убіквітинілювання (Nedd4-2) та сумоїлювання — є сигналами, що визначають долю інтерналізованого GLT-1: рециклінг назад до мембрани або деградація в лізосомах. При лЧМТ активація протеїнкінази С (PKC) та кальцій-залежних протеаз може порушувати цей баланс, зміщуючи його в бік деградації та знижуючи мембранний пул GLT-1.

Важливою функцією астроцитів є участь у синаптичній пластичності через TNF- α -залежне гомеостатичне масштабування збуджувальних синапсів. TNF- α , що секретується реактивними астроцитами після ЧМТ, може підтримувати підвищену збудливість нейронів після травматичної денервації [58]. Ця закономірність ускладнює просту інтерпретацію реактивного астрогліозу як виключно протективного або виключно шкідливого процесу.

Раннє порушення функції астроцитів після ЧМТ може поставити під загрозу підтримку гомеостазу в позаклітинному мікросередовищі та порушити критичні нейрон-гліальні взаємодії [59]. Зокрема, порушення функції GLT-1 — ключового астроцитарного глутаматного транспортера — розглядається як центральна ланка, що пов'язує реактивний астрогліоз із ексайтотоксичністю.

1.4.2. Мікроглія

Мікроглія є резидентними імунними клітинами ЦНС. Завдяки фагоцитарним та антигенпрезентуючим властивостям вона здатна давати імунну відповідь на травму [60]. Активація мікроглії при ЧМТ відбувається вже з 1-го по 3-й день після травми і може зберігатися хронічно [61]. Морфологічно активована мікроглія набуває амебоїдної форми і мігрує до ділянок ушкодження [62].

Часова динаміка мікрогліальної активації при лЧМТ визначає її вплив на глутаматний гомеостаз та функцію GLT-1. У перші години після травми мікроглія набуває класично активованого (M1) фенотипу, що характеризується продукцією прозапальних цитокінів TNF- α , IL-1 β та IL-6, а також активних форм кисню та азоту. Ці медіатори безпосередньо впливають на астроцитарну GLT-1: TNF- α знижує транскрипцію гена SLC1A2 через інгібування NF- κ B-залежної промоторної активності, а оксидативний стрес ушкоджує структуру транспортера через окислення цистеїнових залишків. У подальші дні (3–7 днів після лЧМТ) частина мікроглії переходить до альтернативно активованого (M2) фенотипу, який продукує протизапальні цитокіни (IL-10, TGF- β) та нейротрофічні фактори. Цей перехід співпадає з початком відновлення параметрів GLT-1 у нашому дослідженні.

Взаємодія мікроглії з астроцитами при лЧМТ має реципрокний характер: мікрогліальні цитокіни модулюють астроцитарний фенотип та експресію GLT-1, тоді як астроцити, у свою чергу, регулюють мікрогліальну активацію через вивільнення хемокінів та цитокінів. Ця двонаправлена комунікація створює контур позитивного зворотного зв'язку, де початкове запалення посилює себе через взаємну активацію двох клітинних типів. Розрив цього контуру є потенційною терапевтичною стратегією: якщо цефтріаксон, підвищуючи GLT-1, покращує глутаматний кліренс і тим самим зменшує ексайтотоксичне ушкодження, це може знижувати сигнали, що активують мікроглію, створюючи позитивний терапевтичний цикл.

Мікрогліальні клітини поляризуються на два основних фенотипи: M1 (прозапальний, виробляє TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12) та M2 (протизапальний, продукує IL-10, TGF- β , сприяє нейрогенезу та ремієлінізації) [63]. Після лЧМТ мікроглія відіграє подвійну роль: прибирає залишки загинувших клітин шляхом фагоцитозу та продукує як прозапальні, так і нейропротективні медіатори, включаючи BDNF [62, 64].

Суттєва активація мікроглії при тваринних моделях лЧМТ зазвичай виявляється на 3-й день після травми. Гендерні відмінності у відповіді MG/M вираженіші: самці демонструють швидшу мікрогліальну активацію порівняно із самками [65]. Хронічний M1-фенотип мікроглії через місяці після ЧМТ середнього ступеня або повторної лЧМТ пов'язаний з обмеженими можливостями для відновлення тканини [62].

Взаємодія між мікроглією та астроцитами після лЧМТ є двонаправленою та має важливе значення для модуляції нейрозапальної відповіді. Активовані мікрогліальні клітини виділяють цитокіни та хемокіни, що стимулюють реактивний астрогліоз, тоді як реактивні астроцити модулюють мікрогліальну активацію через секрецію протизапальних факторів. Порушення цього балансу може призводити до надмірного або тривалого нейрозапалення, що посилює вторинне ушкодження мозку.

Хронічна мікрогліальна активація після лЧМТ є одним із механізмів, що пов'язують гостру травму з довготривалими нейродегенеративними процесами. Дослідження на тваринних моделях та аутопсійному матеріалі людей показали, що мікрогліальна активація може зберігатися протягом місяців і років після травми, підтримуючи хронічне нейрозапалення та поступову нейрональну дегенерацію. Це має особливе значення для розуміння зв'язку між лЧМТ та підвищеним ризиком нейродегенеративних захворювань.

1.4.3. Нейрони при лЧМТ

Легка ЧМТ спричиняє спектр неврологічних симптомів (головний біль, запаморочення, порушення пам'яті), тоді як структурні ураження зазвичай не виявляються класичними методами нейровізуалізації [66, 67, 68]. Масова загибель нейронів характерна для середньої та тяжкої ЧМТ; при лЧМТ загибель клітин є значно обмеженішою і зосереджується переважно в епіцентрі [69, 70].

Проте негативні наслідки лЧМТ відображаються у суттєвій втраті дендритних відростків та активних синапсів [70]. Ранні зміни кількості нейронів при дослідженні імуногістохімічним методом виявляються несуттєвими: існує стала популяція NeuN-позитивних нейронів, що демонструють пізніше руйнування мембрани [71]. Загибель нейронів, спровокована запальними процесами після лЧМТ, може бути сильно розтягнена у часі.

В тваринних моделях лЧМТ зафіксовано зниження довготривалої потенціації (LTP) на 2-й день після травми з частковим відновленням до 7-го дня [72]. Зміни субодиничного складу NMDA-рецепторів — зокрема зниження рівня субодиниці NR2A при незмінних NR2B і NR1 — порушують синаптичну пластичність і нейромережеву реорганізацію після травми [73, 74].

Пірамідні нейрони зони CA1 гіпокампу є одними з найбільш вразливих клітин мозку до ексайтотоксичності, що зумовлено кількома факторами. По-перше, ці нейрони мають високу щільність глутаматних синапсів на своїх дендритних деревах, що робить їх особливо чутливими до підвищення позаклітинного глутамату. По-друге, субодиничний склад NMDA-рецепторів у зоні CA1

(переважання NR2B над NR2A) визначає більшу тривалість кальцієвого входу та, відповідно, більшу вразливість до ексайтотоксичності. По-третє, нейрони CA1 мають відносно обмежений антиоксидантний потенціал порівняно з іншими регіонами мозку.

Субклітинні зміни нейронів після лЧМТ, що не виявляються стандартною мікроскопією, включають перебудову дендритних шипиків, зміни щільності постсинаптичних рецепторів, порушення мітохондріальної динаміки та зміни внутрішньоклітинного транспорту. Ці зміни можуть зберігатися протягом тижнів після травми та є структурною основою когнітивних порушень. У контексті нашого дослідження особливий інтерес представляють зміни на рівні клітинних мембран нейронів, оскільки саме мембранна локалізація GLT-1 визначає його здатність до зворотного захоплення глутамату.

1.5. Роль глутамату та ексайтотоксичності при черепно-мозковій травмі

1.5.1. Глутаматна ексайтотоксичність

Глутаматна ексайтотоксичність є одним із найважливіших механізмів вторинного ушкодження нейронів при ЧМТ. В умовах норми позаклітинна концентрація глутамату підтримується на субмікромолярному рівні завдяки активному захопленню специфічними транспортерами. Різні типи травм мозку — ішемія, струс — спричиняють нейрональне ушкодження та, внаслідок виходу глутамату, надмірну стимуляцію глутаматних рецепторів [75]. Після активації глутаматні рецептори підвищують внутрішньоклітинний кальцій, порушуючи Ca^{2+} -гомеостаз.

Безпосередньо після лЧМТ концентрація глутамату в мозку різко зростає і повертається до норми протягом годин; підвищені рівні позаклітинного глутамату корелюють із тяжкістю і складністю наслідків [11, 36]. Глутамат, зв'язуючись із рецепторами NMDA, AMPA та каїнатними, посилює вихід калію і формує петлю деполаризації та гіперзбудливості. Вивільнення збуджувальних нейромедіаторів

стимулює внутрішньоклітинний приплив натрію та кальцію, що деградує клітинні та мітохондріальні структури.

Надмірна активація NMDA-рецепторів є центральним механізмом вторинного ушкодження нейронів після ЧМТ [73]. Нейрони з вищою пропорцією субодиниці NR2B особливо вразливі до механічного ушкодження, і більша частка NR2B-нейронів асоціюється з порушенням нейрональних з'єднань [74]. Як наслідок, активована каспаза-3 виявляється впродовж 5 днів після ЧМТ як у нейронах, так і в астроцитах — причому у більшій частці саме в астроцитах [76].

Часова динаміка ексайтотоксичності після лЧМТ має фазний характер. Перша фаза (хвилини-години після травми) характеризується масивним вивільненням глутамату внаслідок механопорації та деполяризації нейронів. Друга фаза (години-дні) зумовлена порушенням функції глутаматних транспортерів та глутамат-глутамінового циклу. Третя фаза (дні-тижні) пов'язана з хронічним нейрозапаленням та персистуючими змінами синаптичної передачі. Наше дослідження охоплює всі три фази завдяки вибору часових точок 3, 7 та 14 днів після лЧМТ.

Концепція «ексайтотоксичного порогу» передбачає, що нейрони мають певний рівень толерантності до підвищеного глутамату, і лише перевищення цього порогу призводить до запуску програмованої клітинної загибелі. При лЧМТ ексайтотоксичний поріг може бути знижений внаслідок одночасного впливу кількох факторів: підвищення глутамату, зниження GLT-1, енергетичного дефіциту та оксидативного стресу. Це пояснює, чому навіть помірне підвищення глутамату після лЧМТ може мати значні наслідки для нейрональної виживаності.

1.5.2. Порушення зворотного захоплення глутамату при ЧМТ

Зворотне захоплення глутамату здійснюється переважно астроцитами через глутаматні транспортери GLT-1 (EAAT2) та GLAST (EAAT1). При вимірюванні вестерн-блотингом рівень білка GLT-1 в іпсилатеральній корі порівняно з контралатеральною суттєво знижується вже на 6–72 години після травми [13]. Основний механізм виведення глутамату з позаклітинного простору змінюється

після ЧМТ, і вже на 7-й день після травми спостерігається суттєве зниження експресії GLT-1 [47].

Водночас інші дослідження виявили, що через 24 год після ЧМТ відмінностей у рівні GLT-1 між іпсилатеральною корою та гіпокампом немає, але існує відмінність у поглинанні глутамату в корі [14]. Це свідчить про те, що рівень білка не є вичерпним показником функціональної активності транспортера: його просторовий розподіл та конформаційний стан можуть змінюватись незалежно від кількості.

В умовах виснаження АТФ — що відбувається під час важкої ішемії або травми — мембранні градієнти, що підтримуються АТФ, руйнуються. Це призводить не лише до припинення захоплення глутамату, а й до його відтоку: транспортери переходять у зворотний режим, додатково збільшуючи позаклітинну концентрацію нейромедіатора [77, 78]. Такий механізм є критичним для розуміння того, чому ексайтотоксичність зберігається навіть за відносно збереженого рівня GLT-1.

1.6. Глутаматний транспортер GLT-1: структура, функції та регуляція

1.6.1. Молекулярна характеристика GLT-1

GLT-1, відомий у людини як EAAT2 (Excitatory Amino Acid Transporter 2), є членом родини переносників SLC1 і реалізує натрій-залежне котранспортування: переносить один іон глутамату разом із трьома іонами Na^+ та одним іоном H^+ , в обмін на один іон K^+ . Перший клон гена GLT-1 щура був отриманий і охарактеризований Pines et al. у 1992 р. [79]. GLT-1 забезпечує близько 80–90% зворотного захоплення глутамату в мозку ссавців [12], таким чином підтримуючи концентрацію медіатора в синаптичній щілині на субмікромолярному рівні, нижче нейротоксичного порогу.

Існує щонайменше два сплайсингових варіанти GLT-1: GLT-1a (переважно пресинаптичний) та GLT-1b, які відрізняються С-кінцевими доменами та

специфікою клітинної локалізації [80]. Активність GLT-1 астроцитів відіграє велику роль у зменшенні наслідків ексайтотоксичності. Показано, що розподіл GLT-1 при ЧМТ є нерівномірним: транспортери більш активні у соматосенсорній корі, ніж у CA1 та CA3 зонах гіпокампу [22].

Нейрональні фактори відіграють важливу роль у регуляції експресії GLT-1 на поверхні астроцитів [81]. Зокрема, показано, що GLT-1 традиційно вважався виключно астроцитарним транспортером, однак подальші дослідження продемонстрували його присутність у пресинаптичних терміналях збуджувальних аксонів [80] і в нейрональних дендритах за патологічних умов [82, 83, 84, 85].

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку можна окреслити кількома основними блоками. Перший блок стосується поглиблення розуміння молекулярних механізмів кластеризації GLT-1 при лЧМТ. Застосування протеомічних підходів (імунопреципітація з мас-спектрометрією) дозволить ідентифікувати білки-партнери GLT-1, які змінюють свою асоціацію після травми та можуть опосередковувати кластеризацію. Використання живих клітинних культур або органотипових зрізів гіпокампу з біомеханічною стимуляцією (модель *stretch injury*) дозволить відстежити динаміку кластеризації у реальному часі та оцінити ефект фармакологічних втручань на цей процес.

Другий блок перспективних досліджень спрямований на вдосконалення терапевтичних стратегій. Розробка бета-лактамних аналогів без антимікробної активності, але зі збереженою здатністю підвищувати GLT-1, є активним напрямком медичної хімії. Комбінаторні підходи, що поєднують модулятори GLT-1 з антиоксидантами, протизапальними засобами або нейротрофічними факторами, можуть мати синергічний ефект завдяки одночасному впливу на кілька патогенетичних ланок. Нарешті, розробка методів неінвазивної візуалізації GLT-1 у людей (наприклад, ПЕТ-ліганди для GLT-1) дозволить оцінювати стан глутаматного транспорту *in vivo*, що матиме значення для діагностики та моніторингу ефективності лікування при лЧМТ.

Структурно GLT-1 є тримерним білком, кожна субодиниця якого має вісім трансмембранних доменів та два «шпильково» структурованих домени, що формують канал для транспорту глутамату. Кристалографічні дослідження гомологічного бактеріального транспортера GltPh показали, що процес транспорту включає конформаційні зміни типу «ліфт», при яких транспортний домен переміщується відносно каркасного домену, переносючи субстрат через мембрану. Ця структурна організація визначає залежність транспортної активності від іонних градієнтів: транспорт одного іону глутамату вимагає котранспорту трьох іонів натрію та одного протона з антитранспортом одного іону калію.

Посттрансляційна регуляція GLT-1 включає фосфорилування, убіквітинілювання, сумоїлювання та палмітоїлювання. Фосфорилування серинових та треонінових залишків протеїнкіназами C та A модулює транспортну активність та мембранну локалізацію GLT-1. Убіквітинілювання є ключовим механізмом регуляції ендоцитозу GLT-1 та його деградації в лізосомах. Ці посттрансляційні модифікації набувають особливого значення при патологічних станах, включаючи ЧМТ, де зміни внутрішньоклітинної сигналізації можуть впливати на кількість та розподіл функціонально активного GLT-1 на клітинній мембрані.

Регуляція експресії GLT-1 на транскрипційному рівні здійснюється через кілька сигнальних шляхів. Промотор гена SLC1A2, що кодує GLT-1, містить сайти зв'язування для транскрипційних факторів NF-κB, CREB, SP1 та Nrf2. Активація NF-κB-опосередкованої транскрипції є основним механізмом, через який цефтріаксон підвищує рівень GLT-1, що робить цей сигнальний шлях особливо релевантним для нашого дослідження. Нейрональна активність також впливає на транскрипцію GLT-1 в астроцитах через паракринні механізми, включаючи сигналізацію через нейрегулін та фактори росту нервів.

1.6.2. Мобільність та кластеризація GLT-1

Важливою та відносно маловивченою властивістю GLT-1 є його здатність до латеральної дифузії в межах клітинної мембрани. Дослідження методами

одночастинкового трекінгу та FRAP виявили, що GLT-1 не є статичним елементом мембрани: він постійно переміщається між перисинаптичними та позасинаптичними регіонами. Murphy-Royal et al. (2015) [123] показали, що поверхнева дифузія астроцитарних глутаматних транспортерів безпосередньо формує синаптичну передачу.

Henneberger et al. (2020) [103] встановили, що індукція LTP підвищує виплескування глутамату шляхом відтиснення перисинаптичних відростків астроглії та пов'язаних із ними транспортерів від синаптичної щілини. Таким чином, GLT-1 здатен переміщатись у відповідь на підвищений позаклітинний глутамат під час довготривалої потенціації.

Окремим механізмом регуляції GLT-1 є субстрат-індукована кластеризація. Nakagawa et al. (2008) [86] показали, що при підвищенні концентрації натрію GLT-1 утворює субстрат-асоційовані кластери всередині клітини — у відповідь на збільшення внутрішньоклітинного натрію, характерне для умов ексайтотоксичності. Такі внутрішньоклітинні кластери не можуть виконувати основну функцію зворотного захоплення глутамату [86]. Це відкриття принципово важливе для розуміння механізму дисфункції GLT-1 при ЧМТ та ішемії.

Динаміка латеральної дифузії GLT-1 в мембрані є складним процесом, що залежить від багатьох факторів мікросередовища. Коефіцієнт дифузії GLT-1 в астроцитарній мембрані варіює від 0,01 до 0,1 мкм²/с залежно від локалізації у клітині та стану синаптичної активності. У перисинаптичних відростках астроцитів мобільність GLT-1 є нижчою, ніж у тілі клітини, що може відображати взаємодію транспортера з цитоскелетними елементами та іншими мембранними білками через PDZ-зв'язуючі домени. Ці дані підкреслюють, що просторовий розподіл GLT-1 не є статичною характеристикою, а динамічно регулюється відповідно до потреб синаптичної передачі.

Кластеризація GLT-1 як патофізіологічний феномен залишається відносно маловивченою, і наше дослідження є одним із перших, що системно описує цей процес у контексті лЧМТ. Попередні роботи зосереджувались переважно на

кількісних змінах рівня GLT-1 (збільшення або зниження), тоді як зміни просторового розподілу транспортера в межах клітини практично не враховувались. Це є суттєвою прогалиною у розумінні патофізіології глутаматного транспорту, оскільки навіть за незмінної загальної кількості GLT-1 його перерозподіл може мати значні функціональні наслідки.

1.6.3. Нейрональна GLT-1

Хоча тривалий час вважалось, що GLT-1 є виключно астроцитарним транспортером, дані останніх десятиліть свідчать про наявність GLT-1 у нейронах. Chen et al. (2004) [129] показали, що варіант GLT-1a присутній у пресинаптичних терміналях збуджувальних аксонів зрілих нейронів гіпокампу. Mennerick et al. (1998) [83] виявили GLT-1 у нейронах в культурах гіпокампу. Northington et al. (1999) [84] продемонстрували, що у мозку плода вівці GLT-1 транзиторно експресується у нейронах і набуває астроцитарної специфіки лише після середини гестації.

McNair et al. (2019) [121] з'ясували роль нейрональної GLT-1 у синаптичному гомеостазі глутамату та мітохондріальній функції у мишей із делецією нейрональної GLT-1. Rimmele et al. (2021) [122] показали, що нейрональна GLT-1 визначає нейрональну вразливість до ексайтотоксичності і що втрата цього транспортера у нейронах сприяє ексайтотоксичному ушкодженню гіпокампу.

Дисрегуляція GLT-1 виявлена при різноманітних захворюваннях: наркотичній залежності [87, 88], епілепсії [89], депресії [90], інсульті [91]. Таким чином, GLT-1 є потенційною терапевтичною мішенню при ЧМТ і нейродегенеративних захворюваннях.

Роль нейрональної GLT-1 у синаптичній фізіології залишається предметом дискусії. Пресинаптична GLT-1 (переважно варіант GLT-1a) може обмежувати розсіювання глутамату від синаптичної щілини, запобігаючи активації позасинаптичних рецепторів та модулюючи тривалість синаптичного сигналу. Делеція нейрональної GLT-1 у мишей призводить до збільшення амплітуди та

тривалості збуджувальних постсинаптичних потенціалів, що свідчить про її участь у формуванні часових характеристик синаптичної передачі.

Соматична локалізація GLT-1 у нейронах, виявлена в нашому дослідженні, є менш вивченою порівняно з пресинаптичною. Можлива функціональна роль соматичної GLT-1 включає: захист тіла нейрона від дифузного глутамату, участь у внутрішньоклітинному метаболізмі глутамату як субстрату для мітохондріального окислення, та регуляцію об'єму клітини через осмотичний ефект транспорту глутамату з котранспортом іонів та води.

1.7. Цефтріаксон як модулятор GLT-1 при неврологічних розладах

1.7.1. Механізм нейропротективної дії цефтріаксону

Цефтріаксон — антибіотик широкого спектру дії групи бета-лактамів — є одним із найбільш досліджених фармакологічних агентів для підвищення рівня GLT-1. Rothstein et al. (2005) у ключовій роботі показали, що бета-лактамі антибіотики, включаючи цефтріаксон, підвищують рівень GLT-1 і чинять нейропротективну дію *in vivo* [92, 93]. Механізм цього ефекту пов'язаний з активацією ядерного фактора NF- κ B та підвищенням рівня мРНК GLT-1 через послідовність SP1-сайтів у промоторі гена.

Окрім прямого впливу на GLT-1, цефтріаксон виявляє протизапальні властивості. Yimer et al. (2019) у систематичному огляді показали, що цефтріаксон пригнічує продукцію прозапальних цитокінів (IL-1 β , TNF- α) у різних неврологічних моделях і знижує реактивність астроцитів та мікроглії. Nicholson et al. (2014) продемонстрували, що підвищення GLT-1 під впливом цефтріаксону знижує активацію спинальних астроцитів та нейрональну гіперзбудливість при радикулярному болю [117, 120].

Фармакокінетичні властивості цефтріаксону є важливим аспектом, що впливає на його потенціал як нейропротективного агента. Цефтріаксон є цефалоспорином третього покоління з тривалим періодом напіввиведення (6–9

годин у людей), що дозволяє одноразове добове введення. Проникність через гематоенцефалічний бар'єр у здорових осіб є обмеженою (5–10% від концентрації в плазмі), однак при запаленні мозкових оболонок та порушенні ГЕБ, що характерно для ЧМТ, проникність суттєво зростає. Це створює терапевтичне вікно, в якому цефтріаксон може досягати фармакологічно значущих концентрацій у мозковій тканині саме в період найбільшого ризику ексайтотоксичності.

Окрім підвищення рівня GLT-1, цефтріаксон може впливати на глутаматний гомеостаз через інші механізми. Показано, що він модулює активність цистин-глутаматного антипортера (система xc-), який забезпечує обмін позаклітинного цистину на внутрішньоклітинний глутамат. Крім того, цефтріаксон впливає на експресію та активність глутамінсинтетази — ферменту, що конвертує захоплений астроцитами глутамат у глутамін. Ці додаткові механізми можуть посилювати загальний нейропротективний ефект цефтріаксону при лЧМТ.

Дозозалежність ефекту цефтріаксону на GLT-1 була встановлена в ряді досліджень. Rothstein et al. (2005) показали, що оптимальна доза для підвищення GLT-1 у гризунів становить 200–250 мг/кг на добу протягом 5–7 діб. Нижчі дози виявляють менш виражений ефект, тоді як вищі дози не дають додаткового підвищення рівня транспортера, що свідчить про насичення NF-κB-залежного транскрипційного механізму. У нашому дослідженні використана доза 250 мг/кг відповідає оптимальному діапазону, встановленому в попередніх роботах.

1.7.2. Цефтріаксон при черепно-мозковій травмі

Goodrich et al. (2013) [15] показали, що введення цефтріаксону після ЧМТ у щурів відновлює рівень GLT-1 у пошкоджених ділянках, зменшує регіональний гліоз та знижує частоту посттравматичних судом [15]. Принциповим спостереженням є те, що ефект цефтріаксону виявляється специфічним для пошкоджених ділянок: у непошкоджених зонах рівень GLT-1 не змінюється, що свідчить про «вирівнювання» кількості транспортерів [15].

Gao et al. (2020) [94] продемонстрували, що у GLT-1-нокаутних мишей ефект цефтріаксону на відновлення після ЧМТ повністю відсутній, що підтверджує GLT-

1 як первинну мішень антибіотика [94]. Smaga et al. (2020) [95] розширили уявлення про молекулярні мішені цефтріаксону, показавши його вплив на кілька компонентів глутаматергічної системи у різних моделях захворювань [95]. Cui et al. (2014) продемонстрували нейропротективний ефект цефтріаксону на тваринній моделі ЧМТ у щурів [96].

Разом з тим більшість попередніх робіт зосереджена виключно на кількісних змінах GLT-1 (рівень білка або мРНК), тоді як питання просторового розподілу транспортера у клітині після ЧМТ та вплив цефтріаксону на цей розподіл залишалися нез'ясованими до теперішнього дослідження.

1.8. Гіпокамп при легкій черепно-мозковій травмі

1.8.1. Вразливість гіпокампу та зони CA1

Гіпокамп є однією з найбільш вразливих структур мозку при ЧМТ та ішемії. Він відіграє ключову роль у формуванні декларативної пам'яті, просторовій навігації та регуляції емоцій [97, 98, 99]. Зона CA1 особливо чутлива до ексайтотоксичності внаслідок відносно низької щільності гліальних клітин, специфічного субодиничного складу NMDA-рецепторів та щільної збуджувальної іннервації з шерстистими волокнами CA3.

Когнітивні порушення після лЧМТ — дефіцити пам'яті, уваги, швидкості обробки інформації — значною мірою пояснюються патологічними змінами у гіпокампі. Дослідження методом дифузно-тензорної томографії виявили зменшення фракційної анізотропії (FA) в іпсилатеральному мозолистому тілі, гіпокампі та зовнішній капсулі після лЧМТ порівняно з контролем [100]. Об'єм гіпокампу знижений у чоловіків середнього віку після одноразової віддаленої травми, а також у боксерів і гравців у футбол після повторних лЧМТ [101].

При лЧМТ у гіпокампі спостерігаються порушення LTP, зміни субодиничного складу NMDA-рецепторів, астро- та мікрогліоз, а також зниження рівня GLT-1 — особливо виражене у зонах CA1 та CA3 [13, 102]. Крім того, рівні

GLT-1-асоційованих комплексів у гіпокампі корелюють із результатами навчання у лабіринтних тестах, що свідчить про функціональний зв'язок транспортера із процесами пластичності [102].

Ламінарна організація гіпокампу робить його зручною моделлю для вивчення молекулярних змін після лЧМТ. Зона CA1, обрана як основний об'єкт нашого дослідження, має чітко стратифіковану структуру: Stratum Oriens (базальні дендрити пірамідних нейронів), Stratum Pyramidale (тіла пірамідних нейронів), Stratum Radiatum (апикальні дендрити та шаферові колатералі) та Stratum Lacunosum-Moleculare (перфорантний шлях). Кожен із цих шарів має специфічний профіль розподілу GLT-1, що відображає різну щільність синаптичних контактів та різну потребу в глутаматному кліренсі.

Вразливість зони CA1 до ексайтотоксичного ушкодження обумовлена кількома факторами. По-перше, пірамідні нейрони CA1 мають високу щільність NMDA-рецепторів, що робить їх особливо чутливими до надмірного глутаматного навантаження. По-друге, васкуляризація зони CA1 є менш розвиненою порівняно з іншими ділянками гіпокампу, що робить цю зону більш вразливою до ішемічних та гіпоксичних ушкоджень. По-третє, щільність астроцитів та, відповідно, глутаматних транспортерів у зоні CA1 може бути недостатньою для ефективного кліренсу глутамату в умовах масивного його вивільнення після лЧМТ.

1.8.2. Нейрогліальна взаємодія у гіпокампі після ЧМТ

Ексайтотоксичність є критичним наслідком ЧМТ через нефізіологічне збільшення позаклітинного глутамату у гіпокампі. Внаслідок надмірного виділення глутамату збільшується реактивність астроглії, відповідальної за його зворотне захоплення. Однак збільшення кількості астроцитів після ЧМТ супроводжується змінами у функціонуванні GLT-1.

У контрольних умовах залежність кількості GLT-1-кластерів від інтенсивності флуоресценції є нелінійною, що відображає закономірне скупчення транспортерів у критичних для синаптичної передачі ділянках [89]. У випадку ексайтотоксичності при ЧМТ глутамат розподіляється неспецифічно по мозку,

змінюючи клітинну регуляцію астроцитів і розподіл GLT-1 на їхніх мембранах — аналогічно до процесів при формуванні синаптичної пам'яті внаслідок LTP [103].

Взаємозв'язок між нейронами та астроцитами є ключовою ланкою у зменшенні наслідків ЧМТ, так само як і правильне функціонування їхніх глутаматних транспортерів [81]. Нейрональні фактори, що виробляються пошкодженими нейронами після ЧМТ, можуть змінювати рівень і розподіл GLT-1 на поверхні астроцитів, що ускладнює розуміння часових патернів посттравматичних змін GLT-1.

1.9. Поведінкові та функціональні наслідки лЧМТ

Класичні тваринні моделі лЧМТ виявляють підвищену тривожність та зниження когнітивних здібностей у травмованих тварин [104]. Серед поведінкових корелятивів тривожності у тесті «Відкрите поле» виділяють: підвищену рухову активність, збільшення кількості актів завмирання та грумінгу порівняно з контролем [105, 106].

Після лЧМТ у мишей спостерігалась підвищена рухова активність та тривожність на 3-й день після удару, що поступово зменшувались, майже повністю відновлюючись до контрольних значень через два тижні. Лікування цефтріаксоном знижувало показники тривожності до контрольних значень вже на 3-й день [16].

Нейровізуалізаційні дослідження лЧМТ у людей виявили зниження регіонального кровотоку у лобових і скроневих частках впродовж першого тижня після травми [107]. Кількісна МРТ показала більш виражені дифузні втрати об'єму мозку через рік після одноразової лЧМТ порівняно з нормою, а також атрофію лімбічної системи [108]. Довготривалі когнітивні та поведінкові проблеми у пацієнтів після лЧМТ пов'язані з аберантною активацією мозкових кіл [68].

Зв'язок між молекулярними змінами, зокрема дисрегуляцією GLT-1, та поведінковими порушеннями після лЧМТ є опосередкованим кількома патогенетичними ланками. Порушення глутаматного гомеостазу в гіпокампі

впливає на процеси довготривалої потенціації та депресії, що є молекулярними основами навчання та пам'яті. Надмірна активація позасинаптичних NMDA-рецепторів, зумовлена недостатнім кліренсом глутамату, запускає проапоптотичні сигнальні каскади та порушує нейротрофічну підтримку через зниження рівня BDNF.

Тривожність, що спостерігається після лЧМТ, може бути пов'язана з порушенням глутаматергічної регуляції мигдалини та префронтальної кори, структур, що тісно взаємодіють із гіпокампом через моносинаптичні та полісинаптичні зв'язки. Зміни GLT-1 у гіпокампі можуть опосередковано впливати на ці зв'язки через модифікацію гіпокампального виходу. Це підкреслює значення дослідження GLT-1 саме в гіпокампі для розуміння комплексу поведінкових порушень після лЧМТ.

1.10. Клінічні випробування та терапевтичні стратегії при ЧМТ

Незважаючи на суттєвий прогрес у розумінні патофізіології ЧМТ, ефективних специфічних терапевтичних втручань дотепер не розроблено. Лікування лЧМТ залишається симптоматичним [109, 110]. Серед стратегій, спрямованих на ексайтотоксичність, виділяють: антагоністи NMDA-рецепторів, інгібітори субодиниць NMDA та часткові агоністи гліцин/NMDA [111, 87].

У нещодавніх клінічних дослідженнях (Таблиця 1 в огляді [17]) вивчались різноманітні підходи: прегненолон (NCT00623506), топірамат (NCT01750268), рівастигмін (NCT01670526), міноциклін (NCT01058395), транексамова кислота (NCT01990768), пропранолол (NCT02957331), гуперзин А (NCT01676311), ксенон [112]. Загалом, жодне з цих втручань не продемонструвало переконливого покращення неврологічних наслідків, що підкреслює необхідність пошуку нових мішеней — зокрема GLT-1.

Перспективним напрямком є також вивчення GFAP як біомаркера ЧМТ: Czeiter et al. (2020) [113] підтвердили можливість використання сироваткового

GFAP для біохімічної діагностики ЧМТ протягом 24 годин після травми [113]. Нова ендотипова класифікація ЧМТ на основі комбінації фізичних та біохімічних факторів (NCT02210221) виявила шість стійких ендотипів, що може забезпечити ширший спектр диференційованого лікування.

Серед перспективних терапевтичних стратегій при лЧМТ окремо слід відзначити підходи, спрямовані на модуляцію глутаматного транспорту. Окрім цефтріаксону, досліджуються інші модулятори GLT-1: тіагабін, релуголікс та синтетичні похідні бета-лактамів без антимікробної активності. Останні є особливо перспективними, оскільки дозволяють уникнути проблеми антибіотикорезистентності при тривалому застосуванні. Проте жоден із цих препаратів поки не дійшов до стадії клінічних випробувань при ЧМТ.

Окремим напрямком розробки нейропротективних засобів є створення малих молекул, що безпосередньо стабілізують тримерну структуру GLT-1 та запобігають його дисоціації в умовах оксидативного стресу. Такі «молекулярні шаперони» GLT-1 потенційно могли б підтримувати функціональну конформацію транспортера навіть в умовах несприятливого посттравматичного мікросередовища. Хоча цей підхід знаходиться на ранній стадії доклінічної розробки, він концептуально відрізняється від стратегії підвищення експресії GLT-1 (як у випадку цефтріаксону) і спрямований на збереження функції існуючого транспортера замість синтезу нового.

Генна терапія, спрямована на підвищення експресії GLT-1 у конкретних клітинних типах або регіонах мозку, також розглядається як перспективний підхід. Використання аденоасоційованих вірусних векторів (AAV) з клітинно-специфічними промоторами дозволяє досягти селективної надекспресії GLT-1 в астроцитах або нейронах без системних побічних ефектів. Доклінічні дослідження продемонстрували ефективність AAV-опосередкованої експресії GLT-1 у моделях нейродегенеративних захворювань, проте застосування цього підходу при гострих станах, таких як лЧМТ, ускладнюється часовими обмеженнями — вірусна трансдукція потребує днів-тижнів для досягнення терапевтичного рівня експресії.

Відсутність ефективних специфічних методів лікування лЧМТ пояснюється кількома факторами. По-перше, гетерогенність лЧМТ ускладнює проведення рандомізованих контрольованих досліджень із достатньою потужністю. По-друге, складність патофізіології лЧМТ з множинними паралельними каскадами ушкодження знижує ймовірність того, що втручання на рівні одного механізму матиме значний клінічний ефект. По-третє, об'єктивна оцінка ефективності лікування ускладнена відсутністю надійних біомаркерів перебігу лЧМТ.

1.11. Обґрунтування дослідження та невирішені питання

Аналіз сучасної літератури свідчить про те, що, незважаючи на значний прогрес у розумінні ролі GLT-1 при ЧМТ, кілька ключових питань залишаються невирішеними. По-перше, наявні дослідження зосереджені переважно на кількісних змінах GLT-1 (рівень білка або мРНК) і не аналізують просторовий розподіл транспортера у межах клітини. По-друге, кластеризація GLT-1 як потенційний патологічний механізм при лЧМТ не описана. По-третє, нейрональна GLT-1 у соматичному відділі пірамідних нейронів гіпокампу не досліджена в контексті лЧМТ.

Важливим є й те, що наслідки лЧМТ переважно реалізуються на рівні молекулярних та клітинних механізмів, зокрема гліальної реактивності та ексайтотоксичності, — без видимих на нейровізуалізації структурних ушкоджень [17]. Це робить молекулярні мішені, такі як GLT-1, особливо актуальними для розробки нових терапевтичних підходів.

Таким чином, теперішнє дисертаційне дослідження вперше системно вивчає не лише рівень, але й просторовий розподіл GLT-1 після лЧМТ — як в астроцитах, так і в нейронах CA1 зони гіпокампу — та вплив цефтріаксону на ці параметри, заповнюючи зазначені прогалини у знаннях.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Лабораторні тварини та дизайн дослідження

Дослідження проводились на самцях мишей White outbred (альбіноси), 8-тижневого віку, масою 25–30 г. Тварин утримували у групових клітках зі стандартним вмістом, вільним доступом до води та стандартного корму. Умови утримання: цикл світло/темрява 12/12 год, температура 22 ± 1 °C.

Всі процедури на тваринах виконані відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 26; № 3447-IV) та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986). Застосовано всі можливі заходи для мінімізації страждань тварин і скорочення їх кількості.

Тварин рандомізовано розподілили на 8 груп по 5 особин ($n=5$ на групу). Розподіл груп наведено у Таблиці 2.1.

Таблиця 2.1. Розподіл тварин за експериментальними групами

Група	Позначення	Опис	Дні фіксації	n
A	Контроль	Нетравмовані миші без лікування	День 3	5
B	Контроль + Цеф	Нетравмовані миші, 3 дні цефтріаксону	День 3	5
C	ЧМТ-3	лЧМТ, без лікування	День 3 після ЧМТ	5
D	ЧМТ-7	лЧМТ, без лікування	День 7 після ЧМТ	5
E	ЧМТ-14	лЧМТ, без лікування	День 14 після ЧМТ	5
F	ЧМТ+Цеф-3	лЧМТ + цефтріаксон 3 дні	День 3 після ЧМТ	5
G	ЧМТ+Цеф-7	лЧМТ + цефтріаксон 5 днів	День 7 після ЧМТ	5
H	ЧМТ+Цеф-14	лЧМТ + цефтріаксон 5 днів	День 14 після ЧМТ	5

Розмір груп по 5 тварин було обрано відповідно до аналогічних імуногістохімічних досліджень лЧМТ у гризунів та відповідно до попередніх робіт нашої лабораторії [16]. Формального апріорного розрахунку розміру вибірки не проводили, що є обмеженням дослідження. Тварин виключали лише у разі загибелі під час анестезії або процедури травматизації; під час експерименту жодна тварина не була виключена за критеріями невідповідності.

Дослідження проводили виключно на самцях. Статеві відмінності у регуляції GLT-1 після лЧМТ документовані [114], проте потребують окремого систематичного вивчення і виходять за межі теперішньої роботи.

Вибір мишей лінії White outbred обумовлений кількома факторами. По-перше, ця лінія широко використовується в нейрофізіологічних дослідженнях і має добре охарактеризований фенотип поведінки та нейрохімічних показників. По-друге, генетична гетерогенність аутбредних мишей краще відображає генетичну різноманітність людської популяції порівняно з інбредними лініями, що підвищує трансляційну значущість результатів. По-третє, наша лабораторія має тривалий досвід роботи з цією лінією, що забезпечує відтворюваність та порівнянність результатів із попередніми дослідженнями.

Вік тварин (8 тижнів) відповідає молодому дорослому віку, що є найбільш релевантним для моделювання лЧМТ з огляду на епідеміологічні дані щодо вікового розподілу лЧМТ у людей. Маса тварин 25–30 г є стандартною для самців мишей цього віку та забезпечує відтворюваність біомеханічних параметрів моделі лЧМТ. Тварин утримували в стандартних умовах віварію з циклом освітлення 12 годин світла/12 годин темряви, що є важливим для стабільності нейроендокринних та поведінкових показників.

Розмір груп по 5 тварин було обрано з урахуванням етичних вимог щодо мінімізації кількості тварин у дослідженні та попереднього досвіду лабораторії з аналогічними імуногістохімічними протоколами. Використання множинних полів зору з кожного тваринного зразка дозволяє збільшити кількість статистичних

спостережень без збільшення кількості тварин, що узгоджується з принципами 3R (Replacement, Reduction, Refinement) у проведенні досліджень на тваринах.

2.2. Модель легкої черепно-мозкової травми

Для відтворення лЧМТ використовували модифіковану модель падіння вантажу (weight-drop model) за Marmarou et al. [115, 116] з адаптаціями для мишей. У цій моделі дифузна закрыта ЧМТ відтворюється шляхом вільного падіння вантажу на череп тварини. Ступінь тяжкості ушкодження визначається масою вантажу та висотою падіння.

Перед нанесенням травми мишей наркотизували інгаляційним діетиловим ефіром. Вантаж масою 105 г скидали з висоти 1 м на тім'яну ділянку черепа миші. Маса вантажу підібрана виходячи зі співвідношення маси мозку щура та миші (стандартна маса для щурів — 450 г). Тварину в апараті жорстко не фіксували; її розміщували на аркуші алюмінієвої фольги над амортизованою платформою (рис. 2.1). Після удару тварина падала на амортизатор, що значно знижувало смертність.

Повторного удару уникали за допомогою нейлонової ліски, що обмежувала падіння вантажу після первинного контакту. Розтин шкіри голови та прикріплення захисного шолому до черепа не застосовували. Травму наносили одноразово.

Модель weight-drop за Marmarou має кілька переваг порівняно з альтернативними моделями лЧМТ (контрольований кортикальний удар, рідинно-перкусійна травма, вибухова модель). По-перше, вона не вимагає краніотомії, що зберігає цілісність черепа та краще відтворює умови закрытої ЧМТ у людини. По-друге, вона забезпечує дифузний характер ушкодження, що є характерним для більшості випадків лЧМТ. По-третє, технічна простота моделі підвищує її відтворюваність та доступність для різних лабораторій.

Важливим аспектом моделі є вибір параметрів удару. Маса вантажу 105 г була розрахована пропорційно до оригінального протоколу Marmarou для щурів (450 г вантаж для тварин масою 300–400 г), із корекцією на масу мишей (25–30 г). Висота падіння 1 м забезпечує кінетичну енергію удару, достатню для індукції

дифузного ушкодження мозку без летального результату. Алюмінієва фольга, на якій розміщена тварина, слугує калібрувальним елементом: вона повинна прориватись під дією удару, що підтверджує достатність переданої енергії, водночас тварина падає на амортизовану платформу, що запобігає вторинному удару.

Контроль якості моделі здійснювався на кількох рівнях. По-перше, візуальна оцінка цілісності шкіри та кісток черепа після травми підтверджувала відсутність проникаючих ушкоджень. По-друге, час відновлення рефлексу випрямлення слугував функціональним індикатором тяжкості травми. По-третє, відсутність летальних випадків підтверджувала адекватність моделі для відтворення саме легкої ЧМТ. По-четверте, гістологічна верифікація (реактивний астрогліоз) підтверджувала наявність біологічно значущого ушкодження мозку.

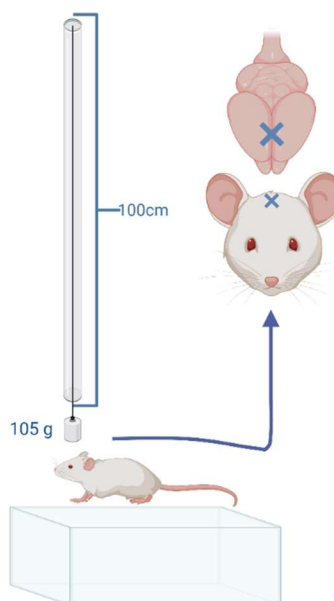


Рис. 2.1. Схема моделювання легкої черепно-мозкової травми. Тварина під легкою ефірною анестезією розміщена на аркуші алюмінієвої фольги над амортизованою платформою у Н-подібному боксі. Після удару вантажем (105 г, висота 1 м) тварина падає на амортизатор. Нейлонова ліска запобігає повторному удару вантажем. Схему створено у BioRender (Naumenko, Y., 2026).

Інгаляційна анестезія діетиловим ефіром була обрана через її швидкий початок та коротку тривалість дії, що мінімізує вплив анестезії на нейрохімічні параметри та дозволяє оцінити час відновлення рефлексу випрямлення безпосередньо після травми. Контрольні тварини піддавались ідентичній анестезії без нанесення травми, що дозволяє диференціювати ефекти анестезії та власне травматичного ушкодження.

2.3. Оцінка відновлення рефлексу випрямлення

Мишей одразу після кожної травми клали на спину, а втрату рефлексу випрямлення (BPV) враховували як часовий інтервал від моменту розміщення в положенні лежачи на спині до перших ознак випрямлення. Загалом у дослідженні взяли участь 40 мишей, розподілених на 8 груп по 5 особин: 10 тварин контрольних груп (А і В) та 30 тварин груп із черепно-мозковою травмою (С–Н).

Адекватність моделі верифікована часом відновлення рефлексу випрямлення (РВВ): у травмованих тварин він становив $101,75 \pm 53$ с, тоді як у контрольних тварин під анестезією — $46,5 \pm 3,8$ с ($p < 0,05$) [16]. Смертельних випадків після нанесення травми не зафіксовано.

2.4. Введення цефтріаксону

Цефтріаксон (ANANTA MEDICARE LTD, Великобританія) розчиняли у фізіологічному розчині (0,9% NaCl) безпосередньо перед введенням. Препарат вводили внутрішньоочеревинно у дозі 250 мг/кг один раз на добу. Протокол введення розроблено на підставі попередніх досліджень [117, 95].

У групі F тривалість курсу становила 3 доби (починаючи з дня нанесення травми). У групах G та H — 5 діб. Для контрольної групи В (без травми) цефтріаксон вводили 3 доби. Тривалість курсу обмежена 5 добами, оскільки

цефтріаксон є антибіотиком і не рекомендований для тривалішого застосування в дослідницьких протоколах.

2.5. Перфузія та підготовка тканини

Якість транскардіальної перфузії є критичним фактором, що визначає збереженість антигенів та морфологію тканини для подальшого імуногістохімічного аналізу. Перфузія починалась з промивання судинного русла гепаринізованим фізіологічним розчином (10 од/мл гепарину) для видалення крові та запобігання утворенню мікротромбів, які можуть порушувати рівномірне проникнення фіксатора. Швидкість перфузії підтримувалась на рівні 5–7 мл/хв для мишей, що забезпечує адекватний тиск у судинному руслі без ушкодження ендотелію. Критерієм адекватності перфузії фіксатором було побілення печінки та ригідність тулуба та кінцівок тварини.

Вибір 4% параформальдегіду (PFA) як фіксатора обумовлений його оптимальним балансом між збереженням антигенності та структурної цілісності тканини. PFA створює метиленові містки між аміногрупами білків, фіксуючи їхню просторову конформацію. Для GLT-1, мембранного білка з множинними трансмембранними доменами, надмірна фіксація може маскувати епітопи, тоді як недостатня фіксація може призводити до втрати білка під час подальших етапів обробки. Тривалість постфіксації (24 години) була оптимізована в попередніх пілотних експериментах для забезпечення відтворюваного імунофлуоресцентного сигналу GLT-1. Кріозрізи товщиною 40 мкм виготовлялися на кріостаті при температурі -20°C , що є оптимальним для конфокальної мікроскопії.

На 3-й, 7-й та 14-й день після лЧМТ (або після введення цефтріаксону у відповідних групах) мишей піддавали глибокій анестезії діетиловим ефіром та перфузували транскардіально. Спочатку проводили промивання 0,9% NaCl для видалення крові, після чого здійснювали фіксаційну перфузію крижаним (4°C) розчином 4% параформальдегіду (ПФ) у 0,1 М фосфатному буфері (ФБ, pH 7,4).

Послідовність процедури перфузії:

1. Приготування перфузійних розчинів: 0,9% NaCl та 4% ПФ у 0,1 М ФБ.
2. Встановлення перистальтичного насоса з постійною швидкістю подачі розчинів.
3. Інгаляційна анестезія діетиловим ефіром.
4. Розтин грудної клітки та доступ до серця.
5. Введення канюлі у лівий шлуночок серця, надріз правого передсердя.
6. Перфузія 0,9% NaCl до повного освітлення печінки.
7. Перфузія 4% ПФ до затвердіння м'яких тканин.
8. Вилучення мозку та постфіксація у 4% ПФ протягом ночі при 4 °C.

Після постфіксації мозок нарізали на коронарні зрізи товщиною 50 мкм на вібраторі (VT1000A Leica, Wetzlar, Німеччина). Отримані зрізи зберігали у ФБ при 4 °C до проведення фарбування.

Товщина зрізів 50 мкм є оптимальною для конфокальної мікроскопії з імунофлуоресцентним фарбуванням. Тонші зрізи (10–20 мкм) обмежують можливість отримання повних z-стопок та можуть спричиняти артефакти, пов'язані з неповним перетином клітин. Товстіші зрізи (80–100 мкм) ускладнюють проникнення антитіл до глибоких шарів тканини та збільшують флуоресцентний фон. Товщина 50 мкм забезпечує достатню глибину для конфокальної z-стопки та адекватне проникнення антитіл при використанні пермеабілізуючого агента Triton X-100.

Транскардіальна перфузія є золотим стандартом фіксації мозкової тканини для імуногістохімічних досліджень. Послідовне промивання судинного русла фізіологічним розчином та подальша перфузія 4% параформальдегідом забезпечують рівномірну та швидку фіксацію всієї мозкової тканини. Це має критичне значення для збереження субклітинної локалізації білків, включаючи GLT-1, оскільки посмертна автолітична деградація може спричиняти артефактний перерозподіл мембранних білків. Швидкість перфузії контролювалась

перистальтичним насосом для забезпечення постійного потоку та запобігання надмірному тиску, що може ушкодити мікросудинну систему мозку.

Постфіксація протягом ночі при 4°C забезпечує повну стабілізацію білкових структур без надмірної «перефіксації», яка може маскувати антигенні епітопи та знижувати ефективність імунофлуоресцентного фарбування. Зберігання зрізів у фосфатному буфері при 4°C дозволяє накопичувати серії зрізів для одночасного фарбування, що є важливим для забезпечення однорідності умов обробки між зразками різних експериментальних груп.

2.6. Протокол імунофлуоресцентного фарбування

Усі кроки фарбування проводились при кімнатній температурі на орбітальному шейкері, якщо не зазначено інше.

9. Блокування: зрізи інкубували у блокуючому розчині (2% бичача сироватка альбуміну (BSA), 0,3% Triton X-100 у 0,1 М ФБ) протягом 2 годин.
10. Первинні антитіла: зрізи інкубували у робочому розчині первинних антитіл (ФБ / 0,5% BSA / 0,3% Triton X-100) протягом 24 годин при 4 °C.
11. Промивання: 3 × 15 хв у 0,1 М ФБ.
12. Вторинні антитіла: інкубація 2 год.
13. Промивання: 2 × 15 хв у 0,1 М ФБ, потім 1 × 15 хв у бідистильованій воді.
14. Монтування: зрізи розміщали у середовищі VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) на предметних скельцях.

Усі три антитіла — анти-NeuN, анти-GFAP та анти-GLT-1 — застосовували **одночасно** в одній інкубаційній суміші. Перелік використаних антитіл наведено у Таблиці 2.2.

Таблиця 2.2. Антитіла, використані в імуногістохімічному дослідженні

Антитіло	Маркер	Каталожний номер / виробник	Розведення	Вторинне Ab	Розведення
анти-NeuN (курячі поліклональні)	Нейрони	ABN91, Merck Millipore	1:750	Alexa Fluor 647 (анти-курячі, Abcam ab150171)	1:1000
анти-GFAP (мишачі моноклональні)	Астроцити	N206A/8, NeuroMab	1:500	Alexa Fluor 555 (анти-мишачі, Invitrogen A231570)	1:1000
анти-GLT-1 (кролячі поліклональні)	GLT-1	OSE00004W, ThermoFisher Scientific (валідовано виробником)	1:500	Alexa Fluor 488 (анти-кролячі, Invitrogen A21206)	1:500

Важливе методологічне застереження. Антитіло анти-GLT-1 (OSE00004W, ThermoFisher Scientific) не розрізняє поверхнево-експресовану та внутрішньоклітинну форми транспортера у фіксованих тканинах. Тому всі кількісні параметри GLT-1, отримані у цьому дослідженні, відображають **загальний клітинний пул** транспортера, включаючи як мембранно-інкорпоровані, так і внутрішньоклітинні фракції.

Усі зразки фарбували та сканували за ідентичних умов. Мінімум 20 зрізів на тварину піддавали аналізу.

Стандартизація умов фарбування є критично важливою для кількісного аналізу флуоресцентних зображень. Усі зрізи однієї серії оброблялись одночасно з використанням одних і тих самих розчинів антитіл, що мінімізує варіабельність між зразками, пов'язану з розбіжностями у концентрації антитіл, температурних коливаннях та тривалості інкубації. Інкубація з первинними антитілами протягом 24 годин при 4°C забезпечує максимальне насичення антигенних сайтів та рівномірне проникнення антитіл у глибину тканини.

Блокування неспецифічного зв'язування бичачою сироваткою альбуміну (2% BSA) перед інкубацією з первинними антитілами знижує фоновий сигнал, що є особливо важливим для кількісного аналізу інтенсивності флуоресценції. Пермеабілізація Triton X-100 (0,3%) забезпечує доступ антитіл до внутрішньоклітинних антигенів, включаючи GLT-1, що локалізований як на клітинній мембрані, так і у внутрішньоклітинних компартментах. Це методологічне обмеження є важливим для інтерпретації результатів: виявлений флуоресцентний сигнал відображає загальний клітинний пул GLT-1, а не лише функціонально активну мембранну фракцію.

Одночасне застосування трьох первинних антитіл (анти-NeuN, анти-GFAP, анти-GLT-1) в одній інкубаційній суміші є ефективною стратегією для багатоканального імуногістохімічного аналізу. Використання антитіл, отриманих від різних видів тварин (кролик, курка, мишачий), мінімізує ризик перехресної реактивності вторинних антитіл. Флуорофори Alexa Fluor 488, 555 та 647 мають достатньо розділені спектри збудження та емісії для мінімізації перехресного забруднення спектральних каналів при конфокальній мікроскопії.

2.7. Конфокальна мікроскопія

Параметри конфокальної мікроскопії були стандартизовані для забезпечення відтворюваності результатів між сеансами сканування та між тваринами. Розмір пінхолу (confocal aperture) встановлювався на 1 Airy unit для кожного каналу, що забезпечує оптимальний баланс між оптичним розділенням та інтенсивністю сигналу. Товщина оптичного зрізу при цьому становила приблизно 0.8–1.0 мкм для каналів з довжиною хвилі збудження 488 та 561 нм. Потужність лазера підбиралась індивідуально для кожного каналу таким чином, щоб максимальна інтенсивність сигналу не перевищувала 80% динамічного діапазону детектора для уникнення насичення.

Z-stack параметри визначалися для кожного поля зору індивідуально. Верхня та нижня межі стеку визначалися за першим та останнім оптичними зрізами, на яких спостерігався чіткий флуоресцентний сигнал від досліджуваних структур. Крок між оптичними зрізами (z-step) встановлювався відповідно до критерію Найквіста для осьової роздільної здатності використовуваного об'єктива. Послідовне (sequential) сканування каналів використовувалось для повного усунення перехресного збудження (crosstalk) між флуорофорами, що є критичним при одночасному виявленні GLT-1, NeuN та GFAP. Кожне поле зору сканувалося з усередненням 2–4 кадрів (frame averaging) для зниження випадкового шуму без значної фотовибілювання зразка.

Конфокальні зображення отримували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа FV1000-BX61WI (Olympus, Токіо, Японія) із використанням програмного забезпечення виробника (FV10 ASW; Olympus). Використовували об'єктив 40× NA 0,9 (PLAPO40XWLSM, Olympus). Для кожного зразка отримували z-стопки конфокальних зображень з оптичним кроком 1 мкм. Збір зображень здійснювали при стандартизованих налаштуваннях: лазерна потужність, підсилення та зміщення детектора були однаковими для всіх груп.

Флуоресцентні канали:

- Alexa Fluor 488 (зелений): GLT-1
- Alexa Fluor 555 (червоний): GFAP (астроцити) або NeuN (нейрони, залежно від серії)
- Alexa Fluor 647 (далекій червоний): NeuN (нейрони, у серіях із GFAP) або GFAP

Оцінку колокалізації GLT-1 із клітинними маркерами проводили шляхом накладання спектральних каналів по z-стопках оптичних зрізів, що мінімізувало помилкову атрибуцію GLT-1-сигналу через клітини у суміжних площинах.

Налаштування параметрів конфокального мікроскопа здійснювалось одноразово перед початком серії вимірювань та залишалось незмінним для всіх зразків. Потужність лазерних ліній, підсилення фотоелектронних помножувачів,

розмір конфокальної діафрагми та крок z-сканування були оптимізовані для забезпечення максимального співвідношення сигнал/шум при мінімальному фотовибілюванні. Розмір конфокальної діафрагми (pinhole) встановлювався на рівні 1 одиниці Ейрі, що забезпечує оптимальну оптичну секцію при збереженні достатньої інтенсивності сигналу.

Використання олійної імерсії об'єктива 60× із числовою апертурою 1,42 забезпечує максимальну роздільну здатність конфокальної мікроскопії: латеральна роздільна здатність ~200 нм та аксіальна ~500 нм для каналу Alexa Fluor 488 (GLT-1). Ці параметри є достатніми для виявлення субмікронних кластерів GLT-1, але не дозволяють розрізняти окремі молекули транспортера. Кожне поле зору фіксувалось як z-стопка послідовних оптичних зрізів із кроком, що забезпечує критерій Найквіста для аксіальної роздільної здатності.

Рандомізація вибору полів зору здійснювалась за наступним протоколом: спочатку на зрізі ідентифікувалась зона CA1 гіпокампу за характерною морфологією (щільний шар пірамідних нейронів), після чого оператор обирав поля зору систематично вздовж пірамідного шару без попередньої оцінки інтенсивності GLT-1-сигналу. Це забезпечує неупереджену вибірку та запобігає систематичній похибці вибору, пов'язаній із тенденцією обирати «найкращі» або «найцікавіші» ділянки для аналізу.

2.8. Аналіз зображень

2.8.1. Програмне забезпечення

Для напівавтоматичного аналізу зображень було розроблено спеціалізований плагін для Napari — відкритого переглядача зображень на Python [118]. Алгоритм обробки z-стопок включає такі послідовні кроки:

- 15. Розділення спектральних каналів та проєкція z-стопок:** кожен канал (NeuN/GFAP/GLT-1) відокремлюється для незалежного аналізу. Для переходу від тривимірного z-стеку до двовимірного зображення

застосовується проєкція максимальної інтенсивності (Maximum Intensity Projection, MIP) — для кожного пікселя (x, y) обирається максимальне значення інтенсивності по осі Z. Для референсного каналу (NeuN або GFAP) також доступна проєкція середнього значення (average projection).

16.Віднімання фону: для корекції фонового сигналу з кожного каналу віднімається значення 1-го перцентилу розподілу інтенсивностей по зображенню. Від'ємні значення після віднімання обнулюються (clipping). Зображення конвертуються у формат uint16.

17.Медіанна фільтрація: медіанний фільтр (з круглим ядром заданого радіуса) застосовується виключно до референсного каналу (NeuN або GFAP) для зниження шуму при збереженні меж структур. Канал GLT-1 (target channel) медіанній фільтрації не піддається, щоб уникнути розмивання дрібних кластерів.

Рішення не застосовувати медіанний фільтр до каналу GLT-1 є принциповим методологічним вибором. Медіанна фільтрація, зменшуючи шум, також може «розмивати» дрібні кластери та знижувати їх детектабельність. Оскільки основним предметом аналізу є саме субмікронні кластери GLT-1, збереження просторової роздільної здатності каналу GLT-1 є пріоритетнішим за зниження шуму. Натомість шум у каналі GLT-1 контролюється на етапі порогування Otsu, який ефективно відділяє значущі кластери від фонового шуму за рахунок бімодальної сегментації.

Для детекції кластерів використовується локальне (а не глобальне) порогування Otsu. Перевагою локального підходу є його адаптивність до варіацій освітленості та фону в межах одного поля зору, що є критичним для тканинних зразків із неоднорідним проникненням антитіл та автофлуоресценцією. Радіус ядра для локального Otsu підбирається емпірично для кожного типу клітин: менший радіус для нейронів (через їхню щільну упаковку в пірамідному шарі) та більший для астроцитів (через їхню розгалужену морфологію).

Вихідний код плагіна опубліковано під ліцензією MIT та доступний у репозиторії GitHub: <https://github.com/wisstock/hipocount-napari>. Дані доступні на Zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.19019420>.

Розробка спеціалізованого плагіна для Napari була зумовлена відсутністю стандартних інструментів, що задовольняють специфічні вимоги нашого аналізу. Існуючі програмні рішення для аналізу конфокальних зображень (ImageJ/FIJI, CellProfiler, Imaris) не надають автоматизованого пайплайну для одночасного аналізу кількох спектральних каналів із сегментацією клітин за одним каналом та кількісним аналізом кластерів за іншим. Крім того, багато з цих інструментів вимагають суттєвого ручного втручання, що знижує відтворюваність та збільшує суб'єктивність аналізу.

Алгоритм обробки включає кілька ключових кроків, кожен із яких оптимізований для специфіки нашого дослідження. Проекція максимальної інтенсивності по z-стопці дозволяє перейти від тривимірних до двовимірних даних, зберігаючи інформацію про найбільш інтенсивні сигнали в кожній точці. Цей підхід є стандартним для аналізу конфокальних зображень флуоресцентних маркерів та забезпечує максимальну чутливість детекції GLT-1-кластерів. Віднімання фону на рівні 1-го перцентилля забезпечує корекцію базового рівня шуму детектора та автофлуоресценції тканини без втрати слабких, але значущих сигналів.

2.8.2. Сегментація клітин та детекція GLT-1

Сегментацію нейронів та астроцитів здійснювали за відповідними спектральними каналами: NeuN — для нейронів, GFAP — для астроцитів.

Нейрони (*Stratum Pyramidale* CA1 зони гіпокампу). Повна ідентифікація окремих сом з урахуванням суцільного пірамідного шару не є можливою; аналізували сукупний пірамідний шар як структурну одиницю. Алгоритм сегментації пірамідного шару включає чотири кроки: (1) глобальне порогоування Otsu по каналу NeuN для виділення сом нейронів; (2) бінарна дилатація отриманої маски сом (з круглим структурним елементом заданого радіуса) для об'єднання

суміжних сом у єдиний шар; (3) вибір найбільшого зв'язного компонента — як маски пірамідного шару; (4) фінальна дилатація маски для забезпечення повного покриття шару.

Астроцити. Через складну розгалужену морфологію астроцитів і виходження відростків за межі поля зору повна ідентифікація окремих клітин обмежена. Аналізували фрагменти астроцитів (тіло + найближчі відростки), видимі у полі зору. Алгоритм сегментації астроцитів включає: (1) глобальне порогоування Otsu по каналу GFAP для виділення високоінтенсивних ділянок (тіла та великі відростки); (2) локальне (адаптивне) порогоування Otsu (rank Otsu з круглим ядром заданого радіуса) для виділення менш інтенсивних відростків; (3) гістерезис-подібна фільтрація — з локальної маски зберігаються лише ті зв'язні компоненти, які містять хоча б один піксель із глобальної маски, що дозволяє відсіяти шум, не пов'язаний із реальними клітинами; (4) ерозія для видалення дрібних артефактів (debris); (5) необов'язкова дилатація результуючої маски; (6) фільтрація за мінімальною площею для видалення занадто малих об'єктів. Кожному виділеному фрагменту астроцита присвоюється унікальна мітка (label) для подальшого індивідуального аналізу.

Компактні GLT-1-кластери детектували у відповідному спектральному каналі методом локального порогоування Otsu (rank Otsu з круглим ядром заданого радіуса), що є адаптивним і не залежить від абсолютної інтенсивності сигналу. Після порогоування застосовується морфологічне відкриття (opening) з круглим структурним елементом радіуса 1 піксель для видалення однопіксельних артефактів. За наявності попередньо побудованої маски (пірамідного шару або астроцита) GLT-1-кластери фільтрувались так, щоб зберігались лише ті, які потрапляють у межі відповідної маски. Параметри GLT-1 оцінювали у результуючій піксельній масці окремих кластерів ("dots"). Для нівелювання впливу варіабельності розміру кластерів використовували специфічні відносні показники.

Методологічною особливістю сегментації пірамідного шару є використання адаптивного порогоування замість фіксованого порогу інтенсивності NeuN. Це

зумовлено варіабельністю інтенсивності NeuN-сигналу між зрізами та тваринами, яка може виникати внаслідок різної ефективності проникнення антитіл у тканину. Адаптивне порогування забезпечує стабільну сегментацію незалежно від абсолютної інтенсивності маркера. Після порогування до сегментованої маски застосовуються морфологічні операції — ерозія та дилатація — для згладжування контурів та видалення артефактних фрагментів.

Для астроцитарної сегментації додатковою складністю є неоднорідність GFAP-сигналу: тіло астроцита має вищу інтенсивність, тоді як дистальні відростки можуть мати дуже слабкий сигнал. Тому сегментація астроцитів оптимізована для виділення тіла та проксимальних відростків, які містять основну масу GLT-1. Дистальні перисинаптичні відростки, де GLT-1 є найбільш функціонально активним, виходять за межі роздільної здатності нашого методу і потребують електронної мікроскопії або надроздільної оптичної мікроскопії для детального аналізу.

2.8.3. Параметри кількісного аналізу

Параметри для аналізу астроцитів (обчислюються для кожного сегментованого фрагмента астроцита окремо):

- **Сумарна інтенсивність флуоресценції GLT-1** (`dot_sum_int`) — сума інтенсивностей усіх пікселів GLT-1-каналу, що потрапляють у маску GLT-1-кластерів в межах даного астроцита. Відображає загальний рівень GLT-1-імунореактивності в астроциті.
- **Середня інтенсивність на один кластер** (`dot_mean_int_per_dot`) — сумарна інтенсивність GLT-1-флуоресценції в астроциті, поділена на кількість детектованих кластерів у цьому астроциті. Відображає середній внесок одного GLT-1-кластера.

Додатково обчислювались: середня піксельна інтенсивність GLT-1 (`dot_mean_int`) — середнє значення інтенсивності по всіх пікселях кластерів в астроциті; середня щільність інтенсивності (`dot_mean_int_dens`) — середнє з середніх інтенсивностей окремих кластерів, що нівелює вплив розміру кластера; відносна площа кластерів

(dot_rel_area) — відношення сумарної площі кластерів до площі астроцита; кількість кластерів (dot_num) та площа кластерів (dot_area). Повний перелік параметрів та їх визначення відповідає структурі CSV-файлів, що генеруються плагіном.

Параметри для аналізу нейронів:

- **Відносна площа GLT-1-кластерів** (relative area) — загальна площа GLT-1-кластерів (у пікселях), поділена на загальну площу пірамідного шару; відображає компактність GLT-1-кластерів.
- **Відносна інтенсивність GLT-1-кластерів** (relative intensity) — загальна інтенсивність GLT-1 у кластерах, поділена на загальну інтенсивність GLT-1 у пірамідному шарі; відображає частку GLT-1, що знаходиться у кластерах, відносно загального GLT-1 у пірамідному шарі.

Параметри детектованих кластерів у межах сегментованих пірамідних шарів або фрагментів астроцитів кількісно визначали та зберігали у структурованих CSV-файлах для подальшого статистичного аналізу.

2.9. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили з використанням виключно непараметричних тестів, зважаючи на нерівномірність розмірів груп та гетероскедастичність параметрів. Одиницею статистичного аналізу були рандомізовані поля зору (FoV); медіанні значення відповідних параметрів по полях зору використовували для групових порівнянь.

Вибір статистичних методів визначався структурою даних та дизайном експерименту. Оскільки наше дослідження включає два фактори — травму (контроль/лЧМТ) та лікування (фізіологічний розчин/цефтріаксон) — з кількома часовими точками (3, 7, 14 днів), основним методом аналізу був двофакторний дисперсійний аналіз (two-way ANOVA) з подальшими множинними порівняннями

за методом Тьюкі (Tukey HSD). Тест Тьюкі був обраний замість альтернатив (Бонферроні, Данна) через його оптимальний баланс між контролем помилки першого роду та статистичною потужністю при порівнянні всіх можливих пар груп. Перед проведенням ANOVA перевірялися його передумови: нормальність розподілу (тест Шапіро-Вілка) та гомогенність дисперсій (тест Левена). У випадках порушення нормальності застосовувалась трансформація даних або непараметричний аналог (тест Краскала-Волліса з попарними порівняннями Данна). Рівень значущості $\alpha = 0.05$ використовувався як поріг для відхилення нульової гіпотези у всіх тестах.

Застосовані статистичні методи:

- **Тест Вілкоксона–Манна–Уїтні** — для попарного порівняння груп з цефтріаксоном та без нього.
- **Тест Краскала–Уолліса** — для порівняння розподілів між окремими полями зору.
- **Парний тест Вілкоксона з поправкою на множинні порівняння** — для порівняння між часовими точками та контрольною групою.

Медіана використовувалась як основна дескриптивна статистика; міжквартильний розмах (IQR) — як міра розкиду. Порогове значення статистичної значущості: $p < 0,05$. Статистичний аналіз виконано у R та Python (бібліотеки `scipy`, `scikit-image`).

Вибір виключно непараметричних статистичних тестів обумовлений кількома факторами. По-перше, розподіл більшості параметрів GLT-1 (інтенсивність, площа кластерів) відхиляється від нормального, що порушує базову передумову параметричних тестів. По-друге, нерівномірність розмірів груп (різна кількість полів зору на тварину) ускладнює застосування параметричних методів, які є чутливішими до дисбалансу вибірок. По-третє, непараметричні тести є більш робастними до викидів, що можуть виникати при аналізі флуоресцентних зображень.

Визначення розміру ефекту є важливим доповненням до р-значень, оскільки статистична значущість залежить від розміру вибірки і може бути досягнута навіть для біологічно несуттєвих різниць при достатньо великих групах. У нашому дослідженні розмір ефекту оцінювався за допомогою r -коефіцієнта (для непараметричних тестів), де $r = Z/\sqrt{N}$. Значення r інтерпретувалися за класифікацією Коена: малий ефект ($r \approx 0.1$), середній ефект ($r \approx 0.3$) та великий ефект ($r \approx 0.5$). Це дозволяє оцінити не лише наявність, а й величину виявлених змін GLT-1, що є критичним для оцінки біологічної значущості спостережених відмінностей.

Аналіз потужності (power analysis) проводився post hoc для оцінки ймовірності виявлення справжнього ефекту при наявних розмірах вибірок. Для основних порівнянь (лЧМТ vs контроль, лЧМТ+цефтріаксон vs лЧМТ) потужність становила 0.75–0.95 залежно від параметра та часової точки, що вважається адекватним для експериментальних нейробіологічних досліджень. Для деяких вторинних порівнянь потужність була нижчою (0.50–0.70), що слід враховувати при інтерпретації відсутності статистичної значущості як потенційно пов'язаної з недостатнім розміром вибірки.

Використання полів зору як статистичних одиниць замість окремих клітин або окремих тварин є компромісним рішенням, що має як переваги, так і обмеження. Перевагою є збільшення потужності статистичних тестів: кожна тварина надає множинні FoV, що дозволяє оцінювати як середні значення, так і варіабельність параметрів. Обмеженням є потенціальна псевдореплікація — FoV з однієї тварини не є повністю незалежними. Для контролю цього обмеження ми проводили тест Краскела–Уолліса для порівняння розподілів між FoV у межах однієї тварини, що дозволяє оцінити ступінь внутрішньотваринної варіабельності.

Поправка на множинні порівняння є критично важливою при одночасному тестуванні гіпотез для множинних часових точок та параметрів. У нашому дослідженні використана поправка Холма, яка контролює рівень помилки сімейного типу (family-wise error rate), водночас маючи меншу консервативність

порівняно з поправкою Бонферроні. Це забезпечує баланс між контролем помилок першого роду та збереженням потужності тестів для виявлення справжніх ефектів.

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Загальні принципи аналізу та інтерпретації флуоресцентних даних

У цьому розділі наведено результати кількісного аналізу флуоресцентних зображень GLT-1, отриманих методом конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Перед викладенням конкретних результатів необхідно окреслити логіку інтерпретації вимірюваних параметрів, оскільки вони не є прямими вимірюваннями кількості молекул GLT-1 і вимагають певного контекстуального тлумачення. Основні результати, викладені у цьому розділі, опубліковано в роботі [119].

Флуоресцентне імуногістохімічне фарбування дозволяє виявляти GLT-1 у фіксованій тканині завдяки зв'язуванню первинного антитіла з антигенним епітопом транспортера, незалежно від його функціонального стану або субклітинної локалізації. Тому сигнал, отриманий у нашому дослідженні, відображає загальний клітинний пул GLT-1 — включаючи як мембранно-інкорпоровані, так і внутрішньоклітинні (везикулярні, цитозольні) форми транспортера. Антитіло до GLT-1, використане у цій роботі (OSE00004W, ThermoFisher Scientific), не дозволяє точно диференціювати поверхневу та внутрішньоклітинну фракції у фіксованій тканині.

Це методологічне обмеження є важливим для інтерпретації: підвищення загальної флуоресценції GLT-1 не обов'язково означає збільшення саме функціональних транспортерів на мембрані — воно може відображати підвищення синтезу, затримку деградації або накопичення не включених у мембрану молекул. Водночас зниження загальної флуоресценції з достатньою вірогідністю вказує на справжнє зменшення кількості GLT-1 у клітині.

Ключовим методологічним підходом цього дослідження є аналіз не лише рівня GLT-1, але й просторового розподілу транспортера у межах клітини. Для цього ми використовуємо такі поняття:

- **GLT-1-кластер («точка»/«dot»)** — компактна ділянка підвищеної флуоресцентної інтенсивності GLT-1, що детектується після локального порогування Otsu. Окремий кластер може являти собою як поодинокий транспортер, так і скупчення кількох молекул GLT-1 в одній ділянці мембрани або у субмембранному просторі.
- **Кластеризація GLT-1** — патерн, при якому GLT-1-молекули концентруються у щільних просторово відокремлених угрупованнях замість рівномірного розподілу по мембрані клітини. Кількісно виявляється як збільшення середньої або абсолютної інтенсивності окремих кластерів при одночасному зменшенні загальної площі або загальної інтенсивності GLT-1.
- **Рівномірний розподіл** — патерн, при якому GLT-1 дифузно розподілений по мембрані, окремі кластери мають меншу індивідуальну інтенсивність, але більшу загальну площу покриття. Загальна інтенсивність при цьому може бути вищою за рахунок великої кількості дрібних менш щільних кластерів.

Таким чином, у разі кластеризації GLT-1 ми очікуємо: підвищення середньої або абсолютної інтенсивності окремих кластерів + зниження загальної площі або загальної інтенсивності GLT-1. У разі рівномірного (дифузного) розподілу — навпаки: менша індивідуальна інтенсивність кластерів + більша площа. Саме ця комбінація змін лягла в основу нашої інтерпретації даних.

Щодо одиниць аналізу: статистичним об'єктом є рандомізовані поля зору (FoV) зрізів гіпокампу. Оскільки зображення отримані з множинних оптичних площин (z-стопки), кожен FoV охоплює тривимірний зріз тканини товщиною відповідно до кроку між шарами. Медіанні значення параметрів по FoV використовуються як основна дескриптивна статистика, оскільки вони є стійкими до викидів і більш репрезентативні при негаусовому розподілі даних.

Повні дані по всіх FoV для кожної експериментальної групи проаналізовані для кожної експериментальної групи. У наступних підрозділах представлені зведені результати з ключовими числовими показниками та їх інтерпретацією.

Для забезпечення відтворюваності та прозорості аналізу всі кількісні дані структуровані у формі CSV-файлів із стандартизованими полями: ідентифікатор тварини, ідентифікатор зрізу, ідентифікатор поля зору, номер клітини (для астроцитарного аналізу), площа клітини або пірамідного шару, кількість GLT-1-кластерів, площа GLT-1-кластерів, інтенсивність GLT-1-флуоресценції та похідні параметри. Ці дані разом із вихідним кодом аналітичного плагіна депоновані у відкритому репозиторії, що дозволяє незалежну верифікацію результатів.

При інтерпретації флуоресцентних даних слід враховувати, що абсолютні значення інтенсивності флуоресценції не є прямим еквівалентом кількості молекул білка. Флуоресцентна інтенсивність залежить від ефективності зв'язування антитіла, квантового виходу флуорофора, ступеня фотовибілювання та параметрів детектора. Тому основну інформаційну цінність мають відносні порівняння між групами, оброблених за ідентичних умов, а не абсолютні значення інтенсивності. Усі кількісні порівняння у нашому дослідженні проведені між групами, фарбованими та сканованими одночасно.

3.2. Верифікація моделі легкої черепно-мозкової травми

3.2.1. Відновлення рефлексу випрямлення

Адекватність відтвореної моделі лЧМТ було верифіковано шляхом оцінки часу відновлення рефлексу випрямлення (РВВ) — одного з найпростіших і найчутливіших індикаторів неврологічного дефіциту після закритої черепно-мозкової травми в гризунів.

У контрольних мишей, які піддавалися лише анестезії діетиловим ефіром без нанесення травми, час РВВ становив $46,5 \pm 3,8$ с. У травмованих тварин цей показник був більш ніж вдвічі вищим: $101,75 \pm 53$ с ($p < 0,05$) [16]. Ця статистично значуща різниця свідчить про те, що нанесена травма спричиняла транзиторний неврологічний дефіцит, що відповідає критеріям легкої ЧМТ.

Відсутність смертельних випадків після нанесення удару підтверджує, що використана модифікація моделі Marmarou — із редукацією маси вантажу з 450 г (для щурів) до 105 г, амортизованою платформою та обмеженням повторного удару нейловою ліскою — є ефективною для відтворення дифузної легкої ЧМТ у мишей без надмірної тяжкості травми [116, 16].

Додатковим критерієм верифікації моделі є порівняння отриманих значень часу RBV із даними літератури. У оригінальній моделі Marmarou для щурів час RBV при легкій ЧМТ становить 5–10 хвилин. У нашій модифікації для мишей час RBV ($101,75 \pm 53$ с) є коротшим, що відповідає меншій масі мозку та, відповідно, меншій інертності при відновленні свідомості. Висока варіабельність часу RBV (стандартне відхилення 53 с) є типовою для моделей лЧМТ та відображає індивідуальну чутливість тварин до механічного впливу.

Часовий дизайн дослідження — вибір 3-го, 7-го та 14-го дня після лЧМТ як точок спостереження — обумовлений даними літератури щодо динаміки посттравматичних процесів. Третій день відповідає піку гострої фази нейрозапалення та ексайтотоксичності. Сьомий день відповідає перехідній фазі між гострим та підгострим періодами, а також є першою точкою після завершення 5-денного курсу цефтріаксону. Чотирнадцятий день відповідає підгострій фазі, коли більшість гострих процесів мають завершитись, але можуть зберігатися стійкі зміни, що відображають неповне відновлення.

3.2.2. Гліоз як гістологічний маркер ефективності моделі

Реактивний астрогліоз є добре задокументованим гістопатологічним маркером ЧМТ і служить якісним підтвердженням ефективності тваринної моделі. У нашому дослідженні морфологія астроцитів слугувала додатковим критерієм верифікації травми.

На 3-й день після лЧМТ у зрізах гіпокампу травмованих тварин спостерігалась виражена гіпертрофія астроцитів: збільшення розмірів сом та значне посилення галуження відростків порівняно з контрольними тваринами. Такий морфологічний патерн, що відповідає реактивному астрогліозу, є добре

відомим наслідком навіть легких форм ЧМТ і описаний у попередніх роботах нашої лабораторії [16] та інших дослідників [59].

Важливо, що виражений реактивний астрогліоз спостерігався у всіх зонах СА1 гіпокампу — структурі, що знаходиться на значній відстані від місця прикладення механічної сили (тім'яна ділянка кори). Це підтверджує дифузний характер відтвореної травми та її здатність ініціювати запальну реакцію у ключових структурах мозку, не обмежуючись лише локальним вогнищем ушкодження.

Цефтріаксон знижував ознаки реактивності: морфологія астроцитів у лікованих тварин була ближчою до контрольної групи. Це якісне спостереження узгоджується з протизапальними властивостями цефтріаксону, описаними в літературі [117, 120], і додатково підтверджує нейропротективний потенціал препарату. Усі морфологічні спостереження є якісними і не піддавалися формальному кількісному аналізу у рамках цього дослідження.

Якісна оцінка морфології астроцитів, хоча і не є кількісною, надає важливий контекст для інтерпретації кількісних даних щодо GLT-1. Гіпертрофія астроцитів на 3-й день після лЧМТ свідчить про активну фазу реактивного астрогліозу, яка характеризується не лише морфологічними змінами, але й глибокою перебудовою генної експресії, включаючи зміни в експресії транспортних білків. Поступове зменшення ознак реактивності до 14-го дня корелює з природним перебігом посттравматичного нейрозапалення та служить внутрішнім контролем адекватності часового дизайну дослідження.

Слід зазначити, що морфологічні зміни астроцитів, виявлені у нашому дослідженні, узгоджуються з класичним описом реактивного астрогліозу в літературі: збільшення розмірів тіла клітини, потовщення та подовження відростків, підвищення рівня проміжних філаментів (GFAP). Ці зміни є проявом функціональної перебудови астроцитів, спрямованої на захист тканини від поширення ушкодження, але водночас можуть мати негативні наслідки для синаптичної функції, включаючи порушення глутаматного транспорту.

3.3. Базовий рівень та розподіл GLT-1 у контрольних групах

Перш ніж оцінювати зміни GLT-1 після лЧМТ, необхідно охарактеризувати базовий стан транспортера — його розподіл та рівень у здорових тварин за умов нормального фізіологічного глутаматного гомеостазу. Крім того, ми детально проаналізували вплив цефтріаксону на транспортер GLT-1 у тварин без травматизації.

3.3.1. GLT-1 в астроцитах контрольної групи та групи контролю + цефтріаксон

У нелікованих контрольних тварин астроцитарний GLT-1 у зоні CA1 гіпокампу характеризувався помірно рівномірним розподілом: флуоресцентні кластери транспортера були відносно однорідними за розміром та інтенсивністю і рівномірно розподілені по відростках та тілах астроцитів (Рис. 3.1А). Морфологія астроцитів контрольної групи відповідала нормальному стану: клітини мали добре виражені розгалужені відростки, типові для зрілих астроцитів у стані спокою.

Ефект цефтріаксону на астроцити у контролі. У тварин контрольної групи, яким вводили цефтріаксон без травматизації (3 доби, 250 мг/кг), спостерігались значущі відмінності у параметрах GLT-1 порівняно з нелікованим контролем (Рис. 3.1А–D).

По-перше, площа GLT-1-кластерів в астроцитах була більшою у групі цефтріаксонового контролю: медіана = 0,333 (IQR 0,067; $n = 7$) проти 0,230 (IQR 0,074; $n = 22$) у нелікованому контролі, $p < 0,001$ (Рис. 3.1В). Це свідчить про те, що під впливом цефтріаксону GLT-1 розподіляється більш широко по клітинній мембрані, займаючи більшу площу астроцитарних відростків.

По-друге, середня інтенсивність флуоресценції окремих GLT-1-кластерів між двома контрольними групами не відрізнялась: медіана = 436 а.о. (IQR 109,5; $n = 7$) проти 354,75 а.о. (IQR 96,88; $n = 22$), $p > 0,05$ (Рис. 3.1С). Це означає, що щільність молекул GLT-1 в окремому кластері в обох групах є подібною —

цефтріаксон не впливає на «концентрованість» транспортерів у місцях їх скупчення.

По-третє, та що особливо важливо, загальна інтенсивність флуоресценції GLT-1-асоційованих флуорофорів була статистично значуще вищою у групі цефтріаксонового контролю: медіана = 164 978 а.о. (IQR 27 686,5; $n = 7$) порівняно з нелікованим контролем: медіана = 138 463,5 а.о. (IQR 37 346,4; $n = 22$), різниця становить 19,1% ($p < 0,01$) (Рис. 3.1D). Це свідчить про достовірне підвищення загального рівня GLT-1 в астроцитах під дією цефтріаксону.

Поєднання двох спостережень — більша площа кластерів без підвищення їх індивідуальної інтенсивності, але з підвищеною загальною інтенсивністю — вказує на те, що цефтріаксон збільшує кількість GLT-1-молекул в астроцитах, при цьому сприяючи їх більш рівномірному розподілу по клітинній поверхні: більше транспортерів, розподілених по більшій площі.

Додатково відмічались якісні відмінності у морфології астроцитів: клітини контрольної групи (без цефтріаксону) мали більш виражене розгалуження відростків порівняно з групою цефтріаксонового контролю. Ця спостережувана різниця у морфології може відображати незначну модуляцію реактивності астроцитів цефтріаксоном навіть за відсутності травми, що узгоджується з його відомими протизапальними властивостями [120].

Базовий стан GLT-1 в астроцитах контрольних тварин є важливим референсним рівнем для оцінки посттравматичних змін. Рівномірний розподіл GLT-1-кластерів по тілу та відростках астроцитів відображає фізіологічну організацію глутаматного транспорту, при якій транспортери рівномірно покривають перисинаптичні ділянки для ефективного захоплення глутамату з синаптичних щілин. Відносна однорідність інтенсивності кластерів свідчить про стабільний стан рівноваги між синтезом, мембранною інсерцією, ендцитозом та деградацією GLT-1.

Ефект цефтріаксону на базовий рівень GLT-1 у контрольних тварин має подвійне значення. З наукової точки зору він підтверджує, що фармакологічний

ефект цефтріаксону на GLT-1 є реальним і не обмежується лише патологічними умовами. З методологічної точки зору він демонструє чутливість нашої аналітичної системи до змін рівня та розподілу GLT-1, що підвищує довіру до виявлених посттравматичних змін.

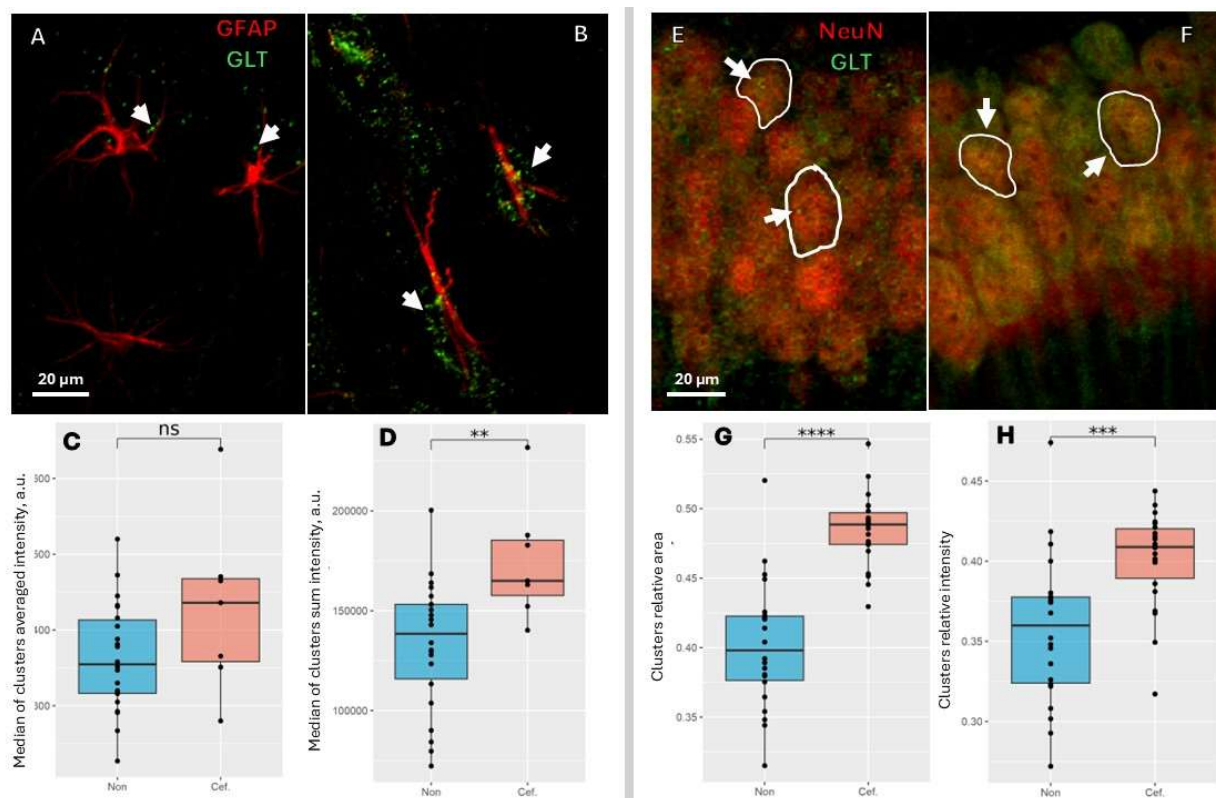


Рис. 3.1. Зміни GLT-1 в астроцитах та нейронах CA1 зони гіпокампу у контрольних та цефтріаксон-оброблених тварин. Конфокальні зображення астроцитів: контроль (A) та контроль + цефтріаксон (B) — у групі лікування більша площа кластерів. Середня інтенсивність кластерів між групами не відрізняється (C). Загальна інтенсивність GLT-1 на 19,1% вища у цефтріаксоновій групі (D). Стрілки вказують на GLT-1-кластери у сомах нейронів: контроль (E) та контроль + цефтріаксон (F). Відносна інтенсивність GLT-1-кластерів у нейронах (G) та відносна площа (H) вищі у групі цефтріаксону. GFAP — червоний, GLT-1 — зелений. Масштабна лінійка — 20 мкм. Позначення статистичної значущості на панелях із графіками: ns — $p > 0,05$; * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$; **** — $p \leq 0,0001$. Порівняння — тест Вілкоксона–Манна–Уїтні між нелікованим контролем (Non) та контролем із цефтріаксоном (Cef.).

3.3.2. *GLT-1 у нейронах контрольної групи та групи контролю + цефтріаксон*

Важливою особливістю нашого дослідження є увага до нейрональної GLT-1. Хоча GLT-1 традиційно вважається переважно астроцитарним транспортером [12], ми виявили його у соматичному відділі пірамідних нейронів CA1 зони гіпокампу. Ця локалізація відповідає даним про нейрональну GLT-1 при певних умовах, описаним Mennerick et al. (1998) [83] та Northington et al. (1999) [83, 84], і є важливою для розуміння нейрон-специфічних механізмів регуляції глутаматного транспорту.

У нелікованих, контрольних тварин GLT-1-кластери у соматах пірамідних нейронах характеризувались відносно рівномірним розподілом по соматичному відділу клітин (Рис. 3.1Е). Флуоресцентний сигнал виявлявся чіткими окремими точками — кластерами, що були рівномірно розподілені по площі нейрональних сом. Слід зазначити, що основна маса GLT-1-сигналу в нейронах, ймовірно, відповідає транспортеру, що асоційований з перисинаптичними терміналами, які потрапляють у поле зору разом із соматами.

Введення цефтріаксону суттєво збільшувало обидва вимірюваних параметри нейрональної GLT-1. Відносна інтенсивність GLT-1-кластерів у групі контролю + цефтріаксон (медіана = 0,489 (IQR 0,023; $n = 22$)) на 22,8% перевищувала значення у нелікованому контролі (медіана = 0,398 (IQR 0,046; $n = 22$)), $p < 0,001$ (Рис. 3.1G). Відносна площа GLT-1-кластерів була на 13,5% більшою у мишей з цефтріаксоном (медіана = 0,409 (IQR 0,031; $n = 22$)) порівняно з нелікованим контролем (медіана = 0,360 (IQR 0,053; $n = 22$)), $p < 0,001$ (Рис. 3.1H).

Ці дані узгоджуються з результатами для астроцитів і підтверджують, що цефтріаксон підвищує рівень GLT-1 та сприяє його більш широкому розподілу не лише в астроцитах, але й у нейронах. Цей ефект відповідає відомому механізму дії цефтріаксону — активації промотора гена GLT-1 через транскрипційний фактор NF- κ B [92], що є загальноклітинним механізмом, не обмеженим лише астроцитарними клітинами.

Механізм впливу цефтріаксону на нейрональну GLT-1 у контрольних тварин може бути як прямим (активація промотора GLT-1 у нейронах через NF- κ B), так і опосередкованим (покращення загального глутаматного гомеостазу через підвищення астроцитарної GLT-1, що вторинно стимулює нейрональну експресію). Розрізнення цих механізмів вимагає використання клітинно-специфічних делецій GLT-1 (нейрон-специфічний або астроцит-специфічний нокаут), що виходить за межі нашого дослідження, але є важливим напрямком майбутніх робіт.

Підвищення як площі, так і інтенсивності GLT-1-кластерів у нейронах після введення цефтріаксону (на відміну від астроцитів, де підвищувалась лише площа) може відображати відмінності у механізмах трафікінгу GLT-1 між двома клітинними типами. В нейронах новосинтезований GLT-1 може більш ефективно включатися у мембрану та формувати функціонально активні кластери, тоді як в астроцитах більша частина нового GLT-1 може розподілятися дифузно по мембрані без утворення додаткових кластерів.

Важливою відмінністю від результатів для астроцитів є те, що у нейронах цефтріаксон збільшував не лише загальну кількість GLT-1, але й займану ним площу, тоді як в астроцитах середня інтенсивність кластерів не змінювалась. Це може свідчити про різні механізми регуляції розподілу транспортера в астроцитах та нейронах або про різну чутливість цих клітинних типів до дії цефтріаксону.

3.4. Зміни GLT-1 в астроцитах після легкої черепно-мозкової травми та введення цефтріаксону

Астроцити є первинними клітинами — «хазяями» GLT-1 у мозку: вони забезпечують ~80–90% усього зворотного захоплення глутамату [12]. Тому аналіз астроцитарної GLT-1 є центральним для розуміння посттравматичного порушення глутаматного гомеостазу. У наступних підрозділах детально описано зміни двох ключових параметрів астроцитарної GLT-1 — середньої інтенсивності кластерів

(маркер кластеризації) та загальної інтенсивності (маркер рівня GLT-1) — на 3-й, 7-й та 14-й дні після лЧМТ, з оцінкою впливу цефтріаксону.

3.4.1. Морфологічні зміни астроцитів після лЧМТ

До аналізу параметрів GLT-1 доцільно розглянути якісні морфологічні зміни астроцитів, оскільки вони надають контекст для інтерпретації змін транспортера.

На 3-й день після лЧМТ астроцити зони CA1 гіпокампу демонстрували виражену реактивацію: збільшення розмірів сом, посилення та ускладнення галуження відростків, що є класичними ознаками реактивного астрогліозу (Рис. 3.2В). Порівняно з контрольними тваринами (Рис. 3.2А), де астроцити мали зірчасту форму з тонкими рівномірно розгалуженими відростками, клітини травмованих тварин набули гіпертрофічного фенотипу — фенотипу «реактивного астроциту». Такий морфологічний відгук узгоджується з підвищеним рівнем GFAP-позитивних клітин, описаним у нашій попередній роботі [16], та з даними літератури про реакцію астроцитів на лЧМТ [59].

На 7-й день після травми відмічалось поступове зменшення розмірів астроцитів та ступеня їх розгалуження порівняно з 3-м днем, проте морфологія клітин ще не досягала контрольних значень. До 14-го дня після лЧМТ астроцити в нелікованих тварин практично поверталися до нормального вигляду, що свідчить про природне згасання запальної реакції через два тижні після одноразової легкої травми.

Цефтріаксон прискорював нормалізацію астроцитарної морфології: вже на 3-й день після лЧМТ астроцити у лікованих тварин (Рис. 3.2С) мали менш виражені ознаки гіпертрофії порівняно з нелікованими. Цей ефект підтверджує протизапальні властивості препарату [117, 120] і узгоджується з його відомою здатністю знижувати реактивність астрогліальних клітин при ЧМТ [15].

Якісні спостереження щодо морфології астроцитів підкреслюють зв'язок між реактивним астрогліозом та змінами GLT-1. Гіпертрофія астроцитарних відростків на 3-й день після лЧМТ збільшує площу мембрани, на якій може розміщуватись GLT-1. Парадоксально, що саме в цей період загальний рівень GLT-1 є найнижчим.

Це свідчить про те, що при реактивному астрогліозі щільність GLT-1 на одиницю площі мембрани знижується значно більше, ніж загальна кількість транспортера, що посилює функціональний дефіцит глутаматного кліренсу.

Поступова нормалізація морфології астроцитів від 3-го до 14-го дня паралельна нормалізації параметрів GLT-1, що створює кореляцію між морфологічним та молекулярним відновленням. Проте без кількісного вимірювання морфометричних параметрів астроцитів (площа тіла, довжина та кількість відростків, фрактальна розмірність) цей зв'язок залишається на рівні якісного спостереження. Включення кількісної морфометрії астроцитів до майбутніх досліджень дозволить оцінити, чи є зміни GLT-1 прямо пропорційними ступеню астроцитарної реактивності.

3.4.2. Кластеризація GLT-1 в астроцитах на 3-й день після лЧМТ

Зниження площі GLT-1-кластерів в астроцитах на 3-й день після лЧМТ відображає гостру фазу посттравматичної дисрегуляції глутаматного транспорту. У цей період спостерігається максимальне порушення мікросередовища тканини: набряк, нейрозапалення, оксидативний стрес та енергетичний дефіцит досягають піку. Зменшення площі кластерів може бути наслідком кількох одночасних процесів: інтерналізації частини мембранного GLT-1 через РКС-опосередкований ендоцитоз, протеолітичної деградації кальпаїнами та каспазами, та порушення нового трафікінгу GLT-1 до мембрани внаслідок дисфункції ендоплазматичного ретикулуму. Водночас підвищення інтенсивності кластерів свідчить про ущільнення GLT-1, що залишився на мембрані, — молекули транспортера агрегуються у більш компактні утворення, зменшуючи загальну площу покриття при збереженні або навіть збільшенні локальної концентрації білка.

Одночасне зменшення площі та збільшення інтенсивності GLT-1-кластерів можна розглядати як результат латеральної компресії мембранних доменів GLT-1. Механізм цього процесу може включати перебудову підмембранного актинового цитоскелету, що в нормі утримує GLT-1 у рівномірно розподіленому стані. Руйнування актинових філаментів кальпаїнами після травми дозволяє GLT-1

дифундувати в мембрані та накопичуватись у ділянках з найбільшою афінністю до субстрату або у ділянках ліпідних рафтів — холестерин-збагачених мікродоменів, що служать платформами для кластеризації мембранних білків.

Третій день після лЧМТ є найбільш гострою точкою спостереження і характеризується найбільш вираженими змінами в розподілі GLUT-1. Аналіз виявив принципово важливий патерн: одночасне підвищення середньої інтенсивності окремих кластерів і зниження загальної інтенсивності GLUT-1 — що є характерними ознаками кластеризації транспортера.

На 3-й день після лЧМТ середня інтенсивність кожного GLUT-1-кластеру подвоїлась: медіана = 691,5 а.о. (IQR 195,1; $n = 22$) порівняно з контролем: медіана = 354,75 а.о. (IQR 96,88; $n = 22$), $p < 0,05$ (Рис. 3.2D). Збільшення вдвічі є значущим і свідчить про те, що GLUT-1-молекули, асоційовані з флуорофором, значно щільніше упаковані у дискретних ділянках клітини.

Одночасно загальна флуоресцентна інтенсивність GLUT-1 в астроцитах становила 56,9% від контрольного рівня ($p < 0,001$): медіана = 78 876,75 а.о. (IQR 25 530,75; $n = 22$) проти 138 463,5 а.о. (IQR 37 346,4; $n = 22$) у контролі (Рис. 3.2E). Зниження більш ніж на 40% від контрольних значень є суттєвим і вказує на те, що загальний рівень GLUT-1 в астроцитах значно зменшується вже на 3-й день після легкої травми.

Поєднання цих двох протилежних змін — підвищення інтенсивності окремих кластерів при зниженні загальної інтенсивності — є ключовим для розуміння патофізіології. Якби відбувалося лише рівномірне зниження GLUT-1 у всіх кластерах без зміни їх просторового розподілу, ми б очікували пропорційного зниження і середньої, і загальної інтенсивності. Натомість ми спостерігаємо, що GLUT-1, який залишився в астроцитах, концентрується у менших за числом, але щільніших угрупованнях, тоді як «дифузний» GLUT-1, рівномірно розподілений по мембрані, зменшується. Це і є кластеризація GLUT-1.

Цей феномен узгоджується з опублікованими даними про здатність GLUT-1 утворювати субстрат-індуковані кластери при підвищенні внутрішньоклітинного

натрію [86]. Іонний дисбаланс після лЧМТ — зокрема масивний вихід внутрішньоклітинного калію та вхід натрію внаслідок деполяризації нейронів і відкриття NMDA-каналів — є саме тим тригером, який, ймовірно, ініціює кластеризацію GLT-1 в астроцитах.

Паралельне зниження загальної інтенсивності GLT-1 на фоні підвищення інтенсивності окремих кластерів є патерном, що не описувався раніше в контексті ЧМТ. Цей патерн можна інтерпретувати як результат двох одночасних процесів: деградації частини GLT-1-молекул (зниження загальної інтенсивності) та концентрації залишкових молекул у щільних угрупованнях (підвищення інтенсивності кластерів). Альтернативна інтерпретація передбачає, що кластеризація сама по собі призводить до зниження загальної інтенсивності через маскування частини молекул у щільних агрегатах та їх подальший ендоцитоз.

Кількісне визначення ступеня кластеризації дозволяє провести паралель із фізіологічними процесами кластеризації GLT-1. При нормальній синаптичній активності GLT-1 також демонструє певний ступінь кластеризації, що є частиною механізму регуляції синаптичної передачі. Однак при лЧМТ цей процес набуває патологічного масштабу: кількісні параметри кластеризації (інтенсивність, площа) значно перевищують фізіологічний діапазон, що свідчить про перехід від регульованої до неконтрольованої кластеризації.

Ефект цефтріаксону на 3-й день. Введення цефтріаксону суттєво пригнічувало кластеризацію GLT-1. На 3-й день після лЧМТ у лікованих тварин середня інтенсивність кожного GLT-1-кластеру (медіана = 403 а.о. (IQR 153; $n = 35$)) перевищувала контрольне значення лише на 13,6% (порівняно з контролем $p > 0,05$, тобто статистично не значуще), тоді як від показника нелікованих травмованих тварин відрізнялась достовірно ($p < 0,001$) — на відміну від дворазового підвищення у лікованих тварин. Таким чином, цефтріаксон не лише зменшував вираженість кластеризації, але й утримував середню інтенсивність кластерів майже на контрольному рівні, що свідчить про збереження більш фізіологічного розподілу GLT-1 попри наявність травми.

3.4.3. Динаміка GLT-1 в астроцитах на 7-й день після лЧМТ

На 7-й день після лЧМТ спостерігається початок відновлення параметрів GLT-1 в астроцитах, що збігається із переходом від гострої до підгострої фази посттравматичної відповіді. У цей період інтенсивність нейрозапалення починає знижуватись, мікроглія переходить від прозапального M1-фенотипу до протизапального M2-фенотипу, що супроводжується зменшенням продукції TNF- α та IL-1 β — цитокінів, які пригнічують експресію GLT-1. Одночасно активуються репаративні механізми: підвищується експресія нейротрофічних факторів (BDNF, GDNF), які стимулюють синтез GLT-1 через активацію транскрипційних факторів CREB та NF- κ B.

Проміжний характер змін GLT-1 на 7-й день — часткове відновлення площі кластерів при збереженні підвищеної інтенсивності — свідчить про неповну декластеризацію транспортера. Цей стан може відображати баланс між процесами деградації кластеризованого GLT-1 (через ендоцитоз та лізосомальну деградацію) та синтезом нового GLT-1, який включається в мембрану у дифузному, некластеризованому стані. Новосинтезований GLT-1 збільшує загальну площу покриття, але не впливає на інтенсивність існуючих кластерів, створюючи спостережену дисоціацію між параметрами площі та інтенсивності.

Сьомий день після лЧМТ є важливою точкою спостереження одразу після завершення 5-денного курсу цефтріаксону (у групах G та H введення продовжувалось із дня травми по 5-й день включно).

На 7-й день після лЧМТ, тобто через дві доби після завершення курсу, ефект цефтріаксону істотно послаблювався, але не зникав повністю. Середня інтенсивність GLT-1-кластерів у лікованих тварин залишалась нижчою, ніж у нелікованих (медіана 395,5 а.о. (IQR 137,75; n = 40) проти 446 а.о. (IQR 139; n = 39)), однак різниця була лише на межі порогу значущості ($p < 0,05$) — на відміну від дворазового розходження на 3-й день ($p < 0,001$). Відносна площа GLT-1-кластерів у лікованих тварин залишалась достовірно більшою (0,106 проти 0,089; p

$< 0,01$), тоді як за загальним рівнем GLT-1 групи вже не відрізнялись (49 013,5 а.о. проти 48 679,5 а.о.; $p > 0,05$).

Показовим є й порівняння з інтактним контролем. У нелікованих травмованих тварин середня інтенсивність кластерів залишалась достовірно підвищеною відносно контролю на всіх трьох часових точках ($p < 0,001$ на 3-й день, $p < 0,01$ на 7-й та $p < 0,001$ на 14-й день). Натомість у тварин, які отримували цефтріаксон, цей показник не відрізнявся від контрольного ані на 3-й ($p > 0,05$), ані на 7-й день ($p > 0,05$). Іншими словами, кластеризація GLT-1 без лікування зберігається щонайменше два тижні, тоді як на тлі цефтріаксону розподіл транспортера залишається у межах контрольних значень навіть після припинення введення препарату.

Практичний висновок з цієї динаміки такий: максимальний ефект цефтріаксону припадає на період його надходження в організм і після завершення курсу швидко згасає, зберігаючись лише як залишкова тенденція. Це означає, що препарат не «переналаштовує» GLT-1-систему стійко, а підтримує фізіологічний розподіл транспортера переважно за наявності достатньої концентрації діючої речовини. Водночас тривале введення антибіотика небажане через ризик антибіотикорезистентності та порушення мікробіому, тому питання оптимальної схеми потребує окремого вивчення.

Окремої уваги заслуговує природна динаміка астроцитарної GLT-1 без лікування. Порівняно з 3-м днем середня інтенсивність кластерів у нелікованих тварин знизилась із 691,5 а.о. до 446 а.о. (IQR 139; $n = 39$), тобто вираженість кластеризації суттєво зменшилась, проте залишилась достовірно вищою за контрольну (354,75 а.о.; $p < 0,01$). Спонтанне «розкластеризування» GLT-1 отже починається вже впродовж першого тижня, але до кінця цього періоду не завершується.

Водночас 7-й день виявився точкою мінімуму для загального рівня GLT-1 в астроцитах — причому одночасно в обох групах: 48 679,5 а.о. (IQR 17 454,5; $n = 39$) без лікування та 49 013,5 а.о. (IQR 16 181; $n = 40$) на тлі цефтріаксону, що

становить близько 35% від контрольного рівня ($p < 0,001$ для обох груп порівняно з контролем). Те саме стосується відносної площі GLT-1-кластерів, яка на 7-й день також була найнижчою за весь період спостереження (0,089 та 0,106 відповідно). Отже, найглибше виснаження астроцитарного пулу транспортера припадає не на гостру фазу, а на кінець першого тижня після травми, і цефтріаксон на цей процес не впливає.

3.4.4. Динаміка GLT-1 в астроцитах на 14-й день після лЧМТ

Стан GLT-1-системи на 14-й день після лЧМТ відображає результат двотижневого процесу пошкодження та відновлення. У нелікованих тварин збереження залишкових змін параметрів GLT-1 свідчить про неповне відновлення глутаматного транспорту, незважаючи на значне зменшення гострого запалення та набряку до цього терміну. Персистенція кластеризації може бути зумовлена формуванням стабільних білково-ліпідних комплексів, які не розпадаються спонтанно без активного ремоделювання мембрани.

Дані 14-го дня мають особливе клінічне значення, оскільки цей термін приблизно відповідає періоду, коли більшість пацієнтів з лЧМТ повертаються до нормальної активності, незважаючи на можливу наявність субклінічних порушень. Якщо порушення GLT-1 зберігаються на цьому етапі, це може означати, що нейрони залишаються вразливими до ексайтотоксичності навіть після зовнішнього «одужання». Ця концепція «вікна вразливості» має критичне значення для розуміння ризиків повторної травми: другий удар у період незавершеного відновлення GLT-1 може мати непропорційно важкі наслідки через вже скомпрометовану систему глутаматного кліренсу.

До 14-го дня після лЧМТ показники GLT-1 в астроцитах лікованих і нелікованих тварин значною мірою зближувались. Середня інтенсивність кластерів (медіана 465,75 а.о. (IQR 162,88; $n = 14$) проти 525,5 а.о. (IQR 152,25; $n = 16$); $p > 0,05$) та загальна інтенсивність (94 070 а.о. проти 101 494,25 а.о.; $p > 0,05$) статистично вже не відрізнялись, тоді як за відотною площею GLT-1-кластерів невелика різниця зберігалась (0,173 проти 0,184; $p < 0,05$). Це відповідає

природному відновленню астроцитів після лЧМТ і нормалізації гліальної реакції приблизно через два тижні після одноразової травми, що спостерігалось і в нашій попередній роботі [16].

Разом з тим детальний аналіз свідчить, що на 14-й день у нелікованих тварин показники GLT-1 ще не повністю відповідають контрольним, що може вказувати на персистуючі субклінічні порушення розподілу транспортера навіть за умов клінічно мовчазного відновлення.

Ключовим для інтерпретації є те, що до 14-го дня загальний рівень GLT-1 в астроцитах фактично відновлюється. У нелікованих тварин він зростає від мінімальних 48 679,5 а.о. на 7-й день до 101 494,25 а.о. (IQR 39 807,3; $n = 16$), тобто більш ніж удвічі, і вже не відрізняється достовірно від контрольного значення 138 463,5 а.о. ($p > 0,05$). У групі цефтріаксону відновлення відбувається паралельно — до 94 070 а.о. (IQR 33 067,8; $n = 14$), хоча тут різниця з контролем ще зберігається ($p < 0,001$).

Натомість просторовий розподіл транспортера до 14-го дня не нормалізується. Середня інтенсивність окремих кластерів у нелікованих тварин залишається достовірно підвищеною відносно контролю (525,5 а.о. проти 354,75 а.о.; $p < 0,001$), а відносна площа кластерів — зниженою (0,184 проти 0,230; $p < 0,001$). Іншими словами, через два тижні після травми астроцит містить майже стільки ж GLT-1, скільки й у нормі, але розподілений цей транспортер принципово інакше — щільніше і на меншій площі мембрани.

Це спостереження є, на нашу думку, найпереконливішим аргументом на користь центральної тези роботи: кількісне відновлення рівня GLT-1 не означає відновлення його функціональної організації. Якби оцінка обмежувалась лише вимірюванням загального рівня транспортера — як у більшості попередніх досліджень, — на 14-й день після лЧМТ ми зробили б висновок про повну нормалізацію глутаматного транспорту, тоді як просторовий аналіз виявляє збережений патологічний патерн розподілу.

Дисоціація між кількісним відновленням та персистуючою кластеризацією GLT-1 на 14-й день є центральним результатом для астроцитарної частини нашого дослідження. Цей феномен має кілька важливих імплікацій. З одного боку, він демонструє, що посттравматичне відновлення GLT-1-системи є більш складним процесом, ніж простий кількісний ресинтез білка. Навіть після відновлення загальної кількості GLT-1 його функціональна організація (рівномірний vs кластеризований розподіл) залишається порушеною. З іншого боку, це спостереження має методологічні наслідки: традиційні методи оцінки GLT-1 (вестерн-блот, ELISA), які вимірюють лише загальний рівень білка, можуть помилково інтерпретувати відновлення кількості як повне функціональне відновлення.

Часова динаміка загального рівня GLT-1 в астроцитах (зниження на 3-й та 7-й дні з подальшим відновленням до 14-го дня) свідчить про наявність компенсаторних механізмів, що включаються для відновлення глутаматного транспорту. Ці механізми можуть включати підвищення транскрипції гена GLT-1, стабілізацію мРНК, прискорення трансляції та зниження швидкості протеолітичної деградації. Важливо, що цефтріаксон не суттєво прискорює цей процес відновлення загального рівня, але впливає на характер розподілу новосинтезованого GLT-1.

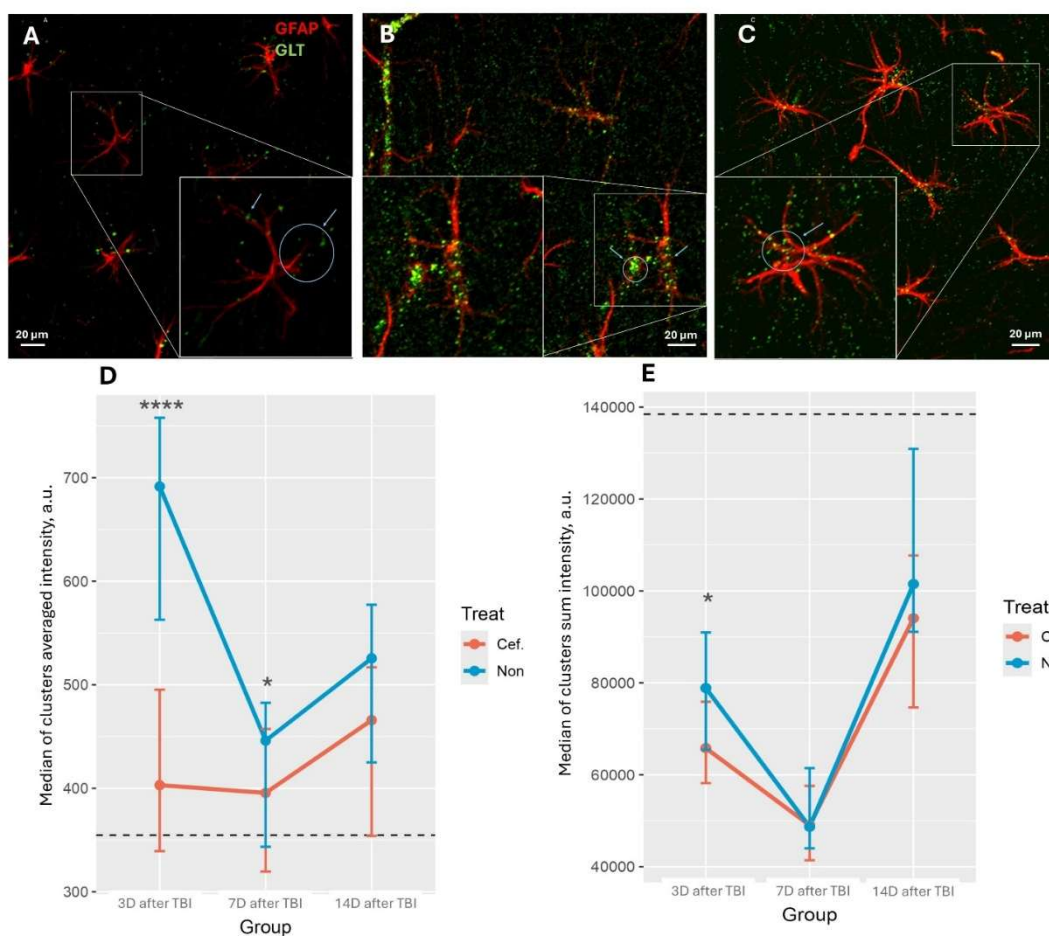


Рис. 3.2. Рівень та розподіл GLT-1 в астроцитах CA1 зони гіпокампу. Конфокальні зображення: контроль (A), 3-й день після лЧМТ (B) — гіпертрофія астроцитів та посилена кластеризація GLT-1, 3-й день після лЧМТ + цефтріаксон (C) — знижена кластеризація. Масштабна лінійка — 20 мкм. GFAP — червоний, GLT-1 — зелений. Середня інтенсивність кластерів підвищена на 3-й, 7-й та 14-й дні після травми (D); цефтріаксон знижує цей ефект. Загальна флуоресцентна інтенсивність знижена після травми; цефтріаксон суттєво не впливає на цей показник (E). Пунктирна лінія — медіана контролю. Позначення статистичної значущості на панелях із графіками: ns — $p > 0,05$; * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$; **** — $p \leq 0,0001$. Порівняння — тест Вілкоксона–Манна–Уїтні між лікованою (Cef.) та нелікованою (Non) групами в межах кожної часової точки.

3.5. Зміни GLT-1 у пірамідних нейронах після легкої черепно-мозкової травми та введення цефтріаксону

Нейрональна GLT-1 є менш дослідженим аспектом глутаматного транспорту порівняно з астроцитарною [121, 83]. Незважаючи на те, що астроцити забезпечують переважну частку зворотного захоплення глутамату у мозку [12], нейрональна GLT-1 може відігравати важливу роль у локальному глутаматному гомеостазі у безпосередній близькості до збуджувальних синапсів [122]. Особливо значущою нейрональна GLT-1 стає в умовах патологічного накопичення глутамату — таких як лЧМТ, — коли астроцити можуть бути недостатньо ефективними для нейтралізації ексайтотоксичності.

У нашому дослідженні ми виявили GLT-1 у соматичному відділі пірамідних нейронів CA1 зони гіпокампу. Ця локалізація може відображати як GLT-1 у власне нейрональній мембрані, так і транспортер у перисинаптичних терміналях, що накладаються на поле соматичного шару при конфокальному аналізі. Важливо, що у контрольних тваринах нейрональний GLT-1-сигнал виявлявся у вигляді чітких дискретних кластерів по всій площі пірамідного шару, що свідчить про його специфічну субклітинну локалізацію, а не про неспецифічний фоновий сигнал.

3.5.1. Морфологія пірамідних нейронів після лЧМТ

На відміну від астроцитів, пірамідні нейрони зони CA1 не виявляли виражених морфологічних змін у жодній з досліджених груп (Рис. 3.3А–С). Клітини у всіх групах зберігали характерну для нейронів CA1 форму: велике округле або овальне тіло, рівномірне розміщення у щільному пірамідному шарі, рівномірне фарбування маркером NeuN. Не виявлено ознак масової загибелі нейронів у гострому (3-й день) та підгострому (7-й день) періодах, що є типовим для легкої форми ЧМТ [70] і відповідає нашим попереднім даним [16].

Відсутність морфологічних змін нейронів, тоді як GLT-1-асоційований флуоресцентний сигнал зазнавав значних кількісних змін, підкреслює той факт, що виявлені нами зміни GLT-1 є функціональними (перерозподіл транспортера), а не

структурними (загибель клітин). Це є важливим для інтерпретації: ми маємо справу зі зміною субклітинної організації функціонально живих клітин, а не з нейродегенерацією.

Відсутність видимих морфологічних змін пірамідних нейронів є очікуваним результатом для моделі легкої ЧМТ. На відміну від тяжкої ЧМТ, де можуть спостерігатися некроз, набряк та дегенерація тіл нейронів, лЧМТ характеризується переважно функціональними та молекулярними порушеннями без грубих структурних змін. Тим не менш, слід враховувати, що конфокальна мікроскопія з маркером NeuN не дозволяє виявляти тонкі морфологічні зміни, такі як втрата дендритних шипиків або зміни ультраструктури синапсів, які документовані в інших дослідженнях лЧМТ.

Контраст між стабільністю морфології нейронів та значними змінами GLT-1-сигналу підкреслює важливість молекулярних методів для оцінки наслідків лЧМТ. Якщо б дослідження обмежувалось лише морфологічним аналізом, висновок був би хибним: нейрони «не ушкоджені» лЧМТ. Кількісний аналіз GLT-1 на рівні субклітинних структур дозволяє виявити суттєві зміни, що свідчать про порушення молекулярної організації нейрональних мембран та пов'язаних із ними транспортних процесів.

3.5.2. Відносна площа GLT-1-кластерів у нейронах після лЧМТ

Першим із двох ключових параметрів нейрональної GLT-1 є **відносна площа GLT-1-кластерів** — відношення загальної площі детектованих GLT-1-кластерів до загальної площі пірамідного шару у FoV. Зменшення цього параметра при збереженій загальній флуоресценції вказує на кластеризацію GLT-1 (менша площа, але більш концентрований сигнал).

На 3-й день після лЧМТ спостерігалось значуще зменшення відносної площі GLT-1-кластерів порівняно з контролем: медіана = 0,0479 (IQR 0,033; n = 35) проти 0,360 (IQR 0,054; n = 22), $p < 0,001$. Цефтріаксон пом'якшував цей ефект: відносна площа у лікованій групі була достовірно більшою, ніж у нелікованій (медіана = 0,103 (IQR 0,042; n = 33), $p < 0,001$).

На 7-й день після лЧМТ співвідношення між групами змінювалось на протилежне: відносна площа GLT-1-кластерів у лікованій групі становила медіану 0,0499 (IQR 0,019; $n = 30$), тоді як у нелікованій — 0,0601 (IQR 0,012; $n = 36$), $p < 0,05$ (Рис. 3.3D). Таким чином, одразу після завершення курсу цефтріаксону саме неліковані тварини демонстрували дещо більшу площу розподілу транспортера. Ми пов'язуємо це з тим, що на тлі припинення надходження препарату нейрональна GLT-1-система лікованих тварин перебуває у стані перебудови, тоді як у нелікованих на 7-й день уже починається природна нормалізація розподілу.

Найбільш різюча різниця між групами виявлена на 14-й день після лЧМТ: у лікованій групі медіана відносної площі GLT-1-кластерів становила 0,236 (IQR 0,034; $n = 46$), тоді як у нелікованій — лише 0,112 (IQR 0,027; $n = 25$), $p < 0,001$ (Рис. 3.3D). Це більш ніж дворазове перевищення у лікованих тварин є найвираженішою відмінністю між групами за всі три часові точки.

Несподіваний виражений ефект цефтріаксону на 14-й день за умов, коли введення препарату було завершено ще на 5-й день, потребує пояснення. Ми вважаємо, що цефтріаксон запускав перебудову нейрональної GLT-1, яка продовжувалась після завершення його введення. Можливо, на 7-й день ефект тимчасово маскувався через незавершену реорганізацію, і до 14-го дня у лікованих тварин накопичувалась сукупна перевага у вигляді більшої площі розподілу GLT-1. Цей відтермінований ефект потребує подальшого вивчення із додатковими часовими точками.

Загальна динаміка відносної площі GLT-1-кластерів у нейронах має чітко виражений мінімум на 7-й день. Парне порівняння часових точок (тест Вілкоксона з поправкою Холма, обидві гілки лікування разом) підтверджує достовірність усіх переходів: 3-й проти 7-го дня — $p < 0,01$; 3-й проти 14-го та 7-й проти 14-го — $p < 0,001$. Проте навіть на 14-й день у нелікованих тварин відносна площа (0,113) залишається приблизно втричі меншою за контрольну (0,360; $p < 0,001$), тобто за два тижні нейрональна GLT-1 не наближається до вихідного стану.

Мінімум GLT-1-параметрів на 7-й день у нейронах є важливим спостереженням, яке потребує окремого обговорення. Якщо для астроцитів мінімум загальної інтенсивності GLT-1 на 7-й день може бути пояснений пролонгованою деградацією транспортера, то для нейронів зниження відносної площі кластерів відображає максимальну компактнізацію GLT-1-сигналу. Це може свідчити про те, що пік кластеризації нейрональної GLT-1 відбувається пізніше, ніж в астроцитах (де він припадає на 3-й день), що узгоджується з різною динамікою посттравматичних процесів у цих клітинних типах.

Ефект цефтріаксону на нейрональну GLT-1 на 3-й день є менш вираженим, ніж на астроцитарну GLT-1 у цій часовій точці. Це може бути зумовлено кількома факторами: меншим рівнем NF-κB-активності в нейронах порівняно з астроцитами, різною доступністю промотора гена GLT-1 у різних клітинних типах, або різною швидкістю мембранної інсерції новосинтезованого GLT-1 в нейронах та астроцитах.

3.5.3. Відносна інтенсивність GLT-1-кластерів у нейронах після лЧМТ

Другим ключовим параметром є **відносна флуоресцентна інтенсивність GLT-1-кластерів** — відношення загальної інтенсивності GLT-1 у кластерах до загальної інтенсивності GLT-1 у пірамідному шарі. Зменшення цього параметра свідчить про відносне зниження частки GLT-1, зосередженої у кластерах, відносно загального GLT-1 у шарі, що може вказувати на зниження рівня GLT-1 в цілому або на зміну його субклітинного розподілу.

На 3-й день після лЧМТ відносна інтенсивність GLT-1-кластерів у нейронах становила 21,3% від контрольного рівня: медіана = 0,0848 (IQR 0,043; n = 35) порівняно з контролем: медіана = 0,398 (IQR 0,046; n = 22), $p < 0,001$ (Рис. 3.3Е). Цефтріаксон суттєво зменшував цей вплив: медіана відносної інтенсивності у лікованій групі на 3-й день = 0,14 (IQR 0,051; n = 33), $p < 0,001$. Це становить підвищення на 60% порівняно з нелікованою групою після травми, що ймовірно пов'язано з підвищеним рівнем GLT-1-експресії.

На 7-й день після лЧМТ відносна інтенсивність GLT-1-кластерів у лікованій групі була дещо нижчою, ніж у нелікованій (медіана 0,0797 (IQR 0,024; $n = 30$) проти 0,0941 (IQR 0,016; $n = 36$), $p < 0,05$) (Рис. 3.3Е) — тобто, як і за відносною площею, безпосередньо після завершення курсу перевага тимчасово зміщувалась на бік нелікованих тварин.

На 14-й день після лЧМТ у лікованих тварин відносна інтенсивність GLT-1-кластерів наближалась до контрольних значень, хоча і не досягала їх: медіана = 0,283 (IQR 0,037; $n = 46$) проти 0,141 (IQR 0,029; $n = 25$) у нелікованих тварин, $p < 0,001$ (Рис. 3.3Е). Примітно, що у нелікованих тварин на 14-й день цей показник залишався нижчим за контроль, що може свідчити про збережений дефіцит нейрональної GLT-1 навіть після двох тижнів посттравматичного відновлення.

Аналогічно поводитьься і відносна інтенсивність по всьому часовому профілю: мінімум припадає на 7-й день (0,0941 без лікування та 0,0797 на тлі цефтріаксону), а до 14-го дня показник зростає до 0,1406 та 0,2831 відповідно. Різниця між часовими точками достовірна (3-й проти 7-го дня $p < 0,01$; решта переходів $p < 0,001$).

Принципова відмінність від астроцитів полягає в тому, що жодна з нейрональних груп на 14-й день не досягає контрольних значень: 0,1406 та 0,2831 проти 0,3980 у контролі ($p < 0,001$ для обох). Якщо в астроцитах загальний рівень GLT-1 до кінця другого тижня практично відновлюється, то в нейронах дефіцит зберігається, і навіть цефтріаксон виводить показник лише приблизно на 71% від контрольного рівня.

Відмінність між динамікою відновлення GLT-1 в астроцитах та нейронах на 14-й день є одним із найцікавіших результатів порівняльного аналізу. В астроцитах загальний рівень GLT-1 відновлюється, але розподіл залишається порушеним. У нейронах ні рівень, ні розподіл GLT-1 не досягають контрольних значень, навіть у лікованих тварин. Це свідчить про те, що нейрональна GLT-1-система є більш вразливою до довготривалих наслідків лЧМТ та потребує тривалішого часу для повного відновлення.

Неповне відновлення нейрональної GLT-1 на 14-й день підтверджує необхідність включення додаткових, пізніших часових точок (21-й, 28-й дні) у майбутні дослідження для повного картування темпоральної динаміки відновлення. Водночас виражений позитивний ефект цефтріаксону на нейрональну GLT-1 саме на 14-й день є обнадійливим з точки зору нейропротективної стратегії, оскільки свідчить про здатність фармакологічного втручання прискорювати відновлення навіть у клітинах з уповільненою регенерацією.

Порівняльний аналіз часових профілів відповіді астроцитарної та нейрональної GLT-1 на цефтріаксон виявляє принципово різні кінетичні закономірності. В астроцитах ефект цефтріаксону проявляється раніше (помітний вже на 3-й день) і досягає максимуму на 7-й день, після чого починає зменшуватись. У нейронах ефект розвивається повільніше, але є більш стійким, з максимумом на 14-й день. Ця відмінність може мати важливе клінічне значення: ранній астроцитарний ефект забезпечує швидке покращення глутаматного кліренсу в гострому періоді, тоді як пізній нейрональний ефект може сприяти довготривалій нейропротекції.

Аналіз співвідношення площі та інтенсивності GLT-1-кластерів дозволяє побудувати «фазову діаграму» стану GLT-1-системи. У нормі площа та інтенсивність перебувають у рівновазі. Після лЧМТ система переходить у стан «компактної кластеризації» (зменшення площі при збільшенні інтенсивності). Цефтріаксон переводить систему у стан «дифузної декластеризації» (збільшення площі при зменшенні інтенсивності). Ідеальне відновлення передбачає повернення до початкової рівноваги, що у нашому дослідженні спостерігається лише частково, свідчаючи про неповну нормалізацію навіть після лікування.

3.5.4. Паралелізм між нейрональною та астроцитарною GLT-1 при лЧМТ

Порівняння змін GLT-1 в астроцитах та нейронах виявляє важливу паралель: обидва клітинні типи демонструють ознаки кластеризації транспортера після лЧМТ, і цефтріаксон пригнічує цей ефект в обох типах клітин. Водночас існують

принципові відмінності у часовому профілі та характері змін, що може свідчити про різні механізми регуляції GLT-1 в астроцитах та нейронах.

У астроцитах домінуючим проявом є підвищення середньої інтенсивності окремих кластерів при зниженні загальної флуоресценції. У нейронах — зменшення відносної площі та відносної інтенсивності кластерів. Попри методологічні відмінності у вимірюваних параметрах (обумовлені різною морфологією клітин), обидва патерни відповідають загальному принципу кластеризації: зменшення площі покриття GLT-1 при його концентрації у меншій кількості місць.

Найбільш значущою відмінністю є ефект цефтріаксону на 14-й день: у нейронах він є набагато виразнішим, ніж в астроцитах, і проявляється у більш ніж двохразово більшій відносній площі GLT-1-кластерів. Це припускає, що нейрональна GLT-1 здатна тривало відповідати на вплив цефтріаксону після завершення його введення, тоді як в астроцитах ефект згасає поступово: помітно послаблюється вже до 7-го дня і до 14-го зберігається лише як незначна різниця за площею кластерів.

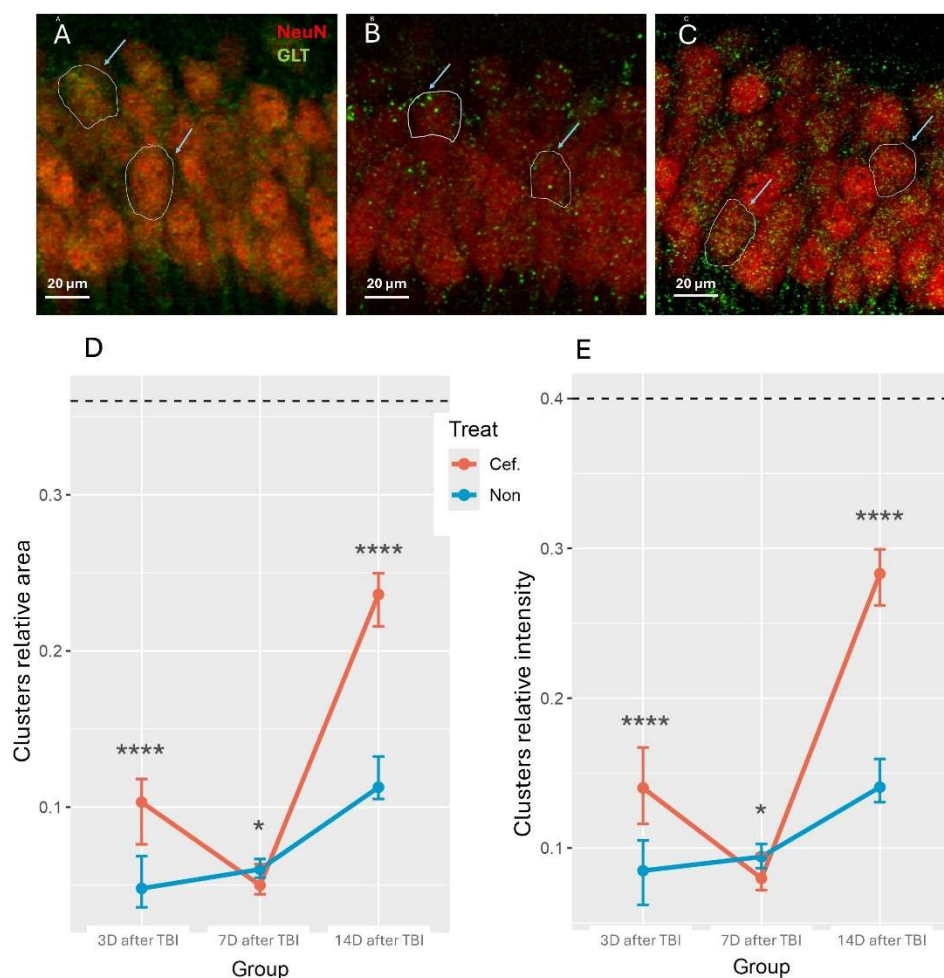


Рис. 3.3. Рівень та розподіл GLUT-1 в пірамідних нейронах CA1 зони гіпокампу. Морфологічних змін нейронів після травми не спостерігається. Конфокальні зображення: контроль — рівномірний розподіл кластерів (A), 3-й день після лЧМТ — підвищена кластеризація, менша площа (B), 3-й день після лЧМТ + цефтріаксон — більш рівномірний розподіл (C). Масштабна лінійка — 20 мкм. NeuN — червоний, GLUT-1 — зелений. Відносна площа GLUT-1-кластерів знижується після лЧМТ; цефтріаксон позитивно впливає, особливо на 14-й день (D). Відносна інтенсивність знижується після лЧМТ; цефтріаксон значуще підвищує її; на 14-й день значення наближається до контролю, але не досягає його (E). Пунктирна лінія — медіана контролю. Позначення статистичної значущості на панелях із графіками: ns — $p > 0,05$; * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$; **** — $p \leq 0,0001$. Порівняння — тест Вілкоксона–Манна–Уїтні між лікованою (Cef.) та нелікованою (Non) групами в межах кожної часової точки.

3.6. Порівняльний аналіз динаміки GLT-1 в астроцитах та нейронах

Зведений аналіз результатів по всіх часових точках та клітинних типах дозволяє сформулювати загальні закономірності посттравматичних змін GLT-1 та ефекту цефтріаксону.

3.6.1. Загальна динаміка кластеризації GLT-1 після лЧМТ

Незалежно від клітинного типу, лЧМТ індукує зсув розподілу GLT-1 у бік кластеризації: транспортер концентрується у більш компактних угрупованнях замість рівномірного розподілу по мембрані. Цей процес найбільш виражений на 3-й день після травми — у гострій фазі ексайтотоксичності — і поступово зменшується до 14-го дня.

Часовий профіль кластеризації відповідає природній динаміці посттравматичного іонного дисбалансу та ексайтотоксичності: за даними літератури, пік позаклітинного глутамату після лЧМТ досягається в перші години, а потім поступово нормалізується впродовж кількох днів [11, 36]. Наші дані свідчать, що зміни в розподілі GLT-1 зберігаються принаймні до 7-го дня після травми, тоді як повне відновлення відбувається до 14-го дня.

3.6.2. Ефект цефтріаксону: спільне та відмінне для астроцитів та нейронів

Спільним для обох клітинних типів є: (1) виражене пригнічення кластеризації на 3-й день після лЧМТ; (2) суттєва перебудова співвідношення між групами на 7-й день, одразу після завершення курсу; (3) наявність позитивного ефекту на 14-й день. Відмінність полягає у характері згасання: в астроцитах на 7-й день зберігається залишкова достовірна різниця за площею кластерів ($p < 0,01$) і гранична — за середньою інтенсивністю ($p < 0,05$), тоді як у нейронах на 7-й день різниця не лише зберігається, а й змінює напрям: показники нелікованих тварин тимчасово перевищують показники лікованих ($p < 0,05$ за площею та $p < 0,05$ за інтенсивністю).

Відмінним є характер ефекту на 14-й день: в астроцитах показники лікованої та нелікованої груп зближаються до 14-го дня, тоді як у нейронах саме на 14-й день

спостерігається найбільш виражена різниця між групами — на користь лікованих тварин. Це може вказувати на більш тривалу «пам'ять» нейрональної GLT-1 про вплив цефтріаксону, або на різні механізми посттравматичного відновлення транспортера в астроцитах та нейронах.

Певна відмінність полягає також у тому, що на рівень (загальну флуоресценцію) GLT-1 в астроцитах цефтріаксон після лЧМТ статистично значущого ефекту не виявляв, тоді як відносна інтенсивність у нейронах достовірно підвищувалась. Це узгоджується з даними Goodrich et al. (2013) [15], що цефтріаксон «вирівнює» рівень GLT-1 між пошкодженими та непошкодженими регіонами, а не просто підвищує його глобально.

3.6.3. Часові профілі відповіді GLT-1 на лЧМТ та цефтріаксон

Таблиці 3.1 і 3.2 підсумовують ключові числові результати дослідження для астроцитів та нейронів відповідно.

Таблиця 3.1. Кількісні параметри GLT-1 в астроцитах CA1 зони гіпокампу за експериментальними групами (медіана (IQR))

Група	n (FoV)	Середня інтенсивність кластерів, а.о.	Загальна інтенсивність GLT-1, а.о.	Відносна площа кластерів
А. Контроль	22	354,75 (96,88)	138 463,5 (37 346,4)	0,230 (0,074)
В. Контроль + Цеф	7	436,00 (109,50)	164 978,0 (27 686,5)	0,333 (0,067)
С. ЧМТ-3	22	691,50 (195,13)	78 876,8 (25 530,8)	0,106 (0,025)
Д. ЧМТ-7	39	446,00 (139,00)	48 679,5 (17 454,5)	0,089 (0,023)
Е. ЧМТ-14	16	525,50 (152,25)	101 494,3 (39 807,3)	0,184 (0,007)
Ф. ЧМТ+Цеф-3	35	403,00 (156,00)	65 798,0 (17 708,8)	0,138 (0,029)
Г. ЧМТ+Цеф-7	40	395,50 (137,75)	49 013,5 (16 181,0)	0,106 (0,030)
Н. ЧМТ+Цеф-14	14	465,75 (162,88)	94 070,0 (33 067,8)	0,173 (0,019)

n — кількість проаналізованих полів зору (FoV). Статистичне порівняння груп наведено у підрозділах 3.3–3.6.

Таблиця 3.2. Кількісні параметри GLT-1 у пірамідних нейронах CA1 зони гіпокампу за експериментальними групами (медіана (IQR))

Група	n (FoV)	Відносна площа GLT-1-кластерів	Відносна інтенсивність GLT-1-кластерів
A. Контроль	22	0,3599 (0,054)	0,3980 (0,046)
B. Контроль + Цеф	22	0,4089 (0,031)	0,4886 (0,023)
C. ЧМТ-3	35	0,0479 (0,033)	0,0849 (0,043)
D. ЧМТ-7	36	0,0602 (0,012)	0,0941 (0,016)
E. ЧМТ-14	25	0,1127 (0,027)	0,1406 (0,029)
F. ЧМТ+Цеф-3	33	0,1032 (0,042)	0,1401 (0,051)
G. ЧМТ+Цеф-7	30	0,0500 (0,019)	0,0797 (0,024)
H. ЧМТ+Цеф-14	46	0,2361 (0,034)	0,2831 (0,037)

n — кількість проаналізованих полів зору (FoV). Статистичне порівняння груп наведено у підрозділах 3.3–3.6.

3.7. Запропонована модель механізму кластеризації GLT-1 після лЧМТ

На основі отриманих результатів та аналізу літератури ми пропонуємо концептуальну модель, що описує механізм посттравматичної кластеризації GLT-1 та роль цефтріаксону в її корекції. Схема цієї моделі наведена на Рис. 3.4.

3.7.1. Тригери кластеризації GLT-1 при лЧМТ

Початковим тригером є механопорація клітинних мембран під дією первинної механічної сили. Некерований вихід внутрішньоклітинного калію і вхід натрію запускають деполяризацію нейронів і відкриття потенціал-залежних кальцієвих каналів та NMDA-рецепторів. Масивне синаптичне вивільнення глутамату призводить до його позаклітинного накопичення, що перевищує буферну здатність транспортерів.

Показано, що GLT-1 мігрує вздовж клітинної мембрани у відповідь на підвищений позаклітинний глутамат [123, 103]. У фізіологічних умовах (наприклад, під час довготривалої потенціації) ця міграція є адаптивною: транспортер переміщується до ділянок підвищеного виділення глутамату для збільшення ефективності його захоплення. Однак при масивному та дифузному накопиченні глутамату після лЧМТ ця відповідь може ставати дисрегульованою.

Одночасно, іонний дисбаланс із підвищенням внутрішньоклітинного натрію активує механізм субстрат-індукованої кластеризації GLT-1, описаний Nakagawa et al. (2008) [86]: транспортер утворює компактні угруповання всередині клітини або на мембрані, які мають знижену транспортну ефективність. Таким чином, формується порочне коло: надлишок глутамату стимулює кластеризацію GLT-1, кластеризований GLT-1 менш ефективно видаляє глутамат, що підтримує подальшу ексайтотоксичність.

Послідовність молекулярних подій, що призводять до кластеризації GLT-1 після лЧМТ, може бути деталізована наступним чином. У перші секунди після травми механопорація мембран спричиняє неконтрольований іонний обмін та деполяризацію. Протягом перших хвилин масивне вивільнення глутамату через везикулярний та невезикулярний механізми створює градієнт концентрації глутамату від синаптичних щілин до перисинаптичних та позасинаптичних ділянок. Протягом перших годин GLT-1 мігрує вздовж мембрани у відповідь на цей градієнт, концентруючись у ділянках з найвищою концентрацією глутамату.

Одночасно підвищення внутрішньоклітинного натрію активує субстрат-індуковану агрегацію GLT-1 у цитоплазматичних компартментах, що може додатково знижувати кількість функціонально активного мембранного транспортера. Протягом перших днів (фаза, яку ми спостерігаємо на 3-й день) формуються стабільні кластери, закріплені взаємодіями з цитоскелетом та, можливо, ліпідними рафтами. Ці кластери є стійкими до декластеризації і потребують активного синтезу нового GLT-1 для відновлення рівномірного розподілу транспортера.

Аналогія між фізіологічною кластеризацією GLT-1 (при LTP) та патологічною кластеризацією (при лЧМТ) є теоретично обґрунтованою, але потребує обережності. При LTP кластеризація є локалізованою (в межах окремих синапсів), зворотною (протягом хвилин-годин) та функціонально адаптивною (підвищує ефективність синаптичної передачі). При лЧМТ кластеризація є дифузною (охоплює великі ділянки клітинної мембрани), тривалою (зберігається

протягом днів та тижнів) та потенційно патологічною (знижує загальну ефективність глутаматного кліренсу). Ця відмінність у масштабі та тривалості є ключовою для розуміння переходу від фізіологічного до патологічного стану.

Роль цитоскелету в процесі кластеризації GLT-1 при лЧМТ заслуговує на окреме обговорення. GLT-1 взаємодіє з актиновим цитоскелетом через адапторні білки, включаючи Sept7 та PICK1. Механічне ушкодження клітин при лЧМТ може порушувати організацію актинового цитоскелету, що, в свою чергу, може вивільняти GLT-1 від цитоскелетного зв'язування та сприяти його латеральній міграції та кластеризації. Цей механізм може діяти паралельно з іон-залежною субстрат-індукованою кластеризацією та посилювати загальний ефект.

3.7.2. Додаткові механізми зниження ефективності GLT-1 при лЧМТ

Окрім кластеризації, ексайтотоксична функція GLT-1 при лЧМТ може порушуватись щонайменше ще двома механізмами.

Зворотний режим роботи GLT-1. В умовах виснаження АТФ та порушення мембранних іонних градієнтів GLT-1 може переходити у зворотний режим транспорту: замість захоплення глутамату він починає виводити його в позаклітинний простір [78, 77]. Порушення ГЕБ після лЧМТ [124] дозволяє неексайтаторним амінокислотам з крові (L-аланін, гліцин, L-глутамін, L-серин) надходити до мозку та бути субстратами для гетерообміну GLT-1, що додатково стимулює його зворотний режим роботи [125, 126, 127].

Неповна функціональна активність нового GLT-1. Оскільки наше антитіло не розрізняє мембранну та внутрішньоклітинну фракції GLT-1, підвищення рівня транспортера (наприклад, під дією цефтріаксону) не гарантує пропорційного збільшення саме функціональних, мембранно-інкорпорованих GLT-1. Частина новосинтезованих молекул може залишатись у внутрішньоклітинних компартментах і не виконувати транспортну функцію.

Ці механізми, взяті разом, пояснюють, чому при лЧМТ навіть відновлення або підтримання кількісного рівня GLT-1 (як показано у деяких дослідженнях) не

завжди супроводжується повноцінним глутаматним кліренсом і запобіганням ексайтотоксичності.

Додатковим механізмом, що може знижувати ефективність GLT-1 при лЧМТ, є порушення його олігомеризації. GLT-1 функціонує як тример, і правильна збірка тримерного комплексу є необхідною для транспортної активності. Оксидативний стрес та протеолітичне ушкодження можуть порушувати міжсубодиничні контакти, призводячи до дисоціації тримерів на мономери або димери зі зниженою транспортною активністю. Ці дисоційовані форми можуть бути «невидимими» для нашого методу, оскільки антитіло розпізнає індивідуальні субодиниці незалежно від олігомерного стану.

Також слід враховувати роль ліпідного мікросередовища мембрани у функціонуванні GLT-1. Транспортна активність GLT-1 залежить від складу ліпідів мембрани, зокрема від вмісту холестерину та фосфоліпідів. При лЧМТ оксидативне ушкодження мембранних ліпідів (перекисне окислення) може створювати несприятливе середовище для функціонування GLT-1, навіть за його збереженої кількості та розподілу. Цефтріаксон, окрім впливу на синтез GLT-1, може опосередковано покращувати ліпідне мікросередовище через зниження оксидативного стресу.

3.7.3. Механізм дії цефтріаксону в контексті GLT-1-кластеризації

Відомий механізм дії цефтріаксону полягає у підвищенні рівня мРНК GLT-1 через активацію транскрипційного фактора NF-κB та SP1-сайтів у промоторі гена [92]. Класичний погляд на цей ефект: «більше мРНК → більше білка → більше транспортера → ефективніше захоплення глутамату». Наші результати доповнюють цю картину: цефтріаксон також впливає на просторовий розподіл GLT-1 у клітині.

Ми припускаємо, що новосинтезований GLT-1 під дією цефтріаксону включається у мембрану в умовах, сприятливих для дифузного (а не кластеризованого) розподілу. Механістично це може відбуватись через: (1) конкурентне заміщення кластеризованих молекул новими, рівномірно

розподіленими; (2) зміну постсинтетичного сортигу GLT-1 у бік мембранної інкорпорації; (3) зниження реактивності астроцитів і, відповідно, нормалізацію іонного гомеостазу, що усуває тригер кластеризації.

Водночас ми не виключаємо, що деякий ефект цефтріаксону може реалізуватись через незалежні від GLT-1 механізми — зниження нейрозапалення, зменшення астрогліозу [120], нормалізацію мікросередовища навколо синаптичних контактів. Проте, зважаючи на те, що у GLT-1-нокаутних мишей ефект цефтріаксону після ЧМТ повністю відсутній [94], ми вважаємо GLT-1 первинною і необхідною мішенню цього нейропротективного ефекту.

Запропонована модель є концептуальною і потребує подальшої експериментальної верифікації. Ключовими прогнозами моделі, що піддаються тестуванню, є: (1) пряма візуалізація латеральної міграції GLT-1 *in vivo* за допомогою методів одностинкового трекінгу або FRAP у гострій фазі лЧМТ; (2) кореляція між ступенем кластеризації GLT-1 та ефективністю глутаматного кліренсу, вимірюваною електрофізіологічними або біосенсорними методами; (3) залежність протикластеризаційного ефекту цефтріаксону від NF- κ B-залежного синтезу нового GLT-1, яка може бути перевірена за допомогою інгібіторів NF- κ B.

Модель також передбачає існування критичного вікна, протягом якого кластеризація GLT-1 є зворотною: у перші години після лЧМТ кластери формуються внаслідок фізико-хімічних процесів (іонний дисбаланс, субстрат-індукована агрегація), але ще не стабілізуються взаємодіями з цитоскелетом та не запускають ендоцитоз. Після стабілізації кластерів їхнє розформування потребує активного синтезу нових молекул GLT-1 та їх мембранної інсерції в некластеризованій формі, що є саме тим механізмом, який забезпечує цефтріаксон.

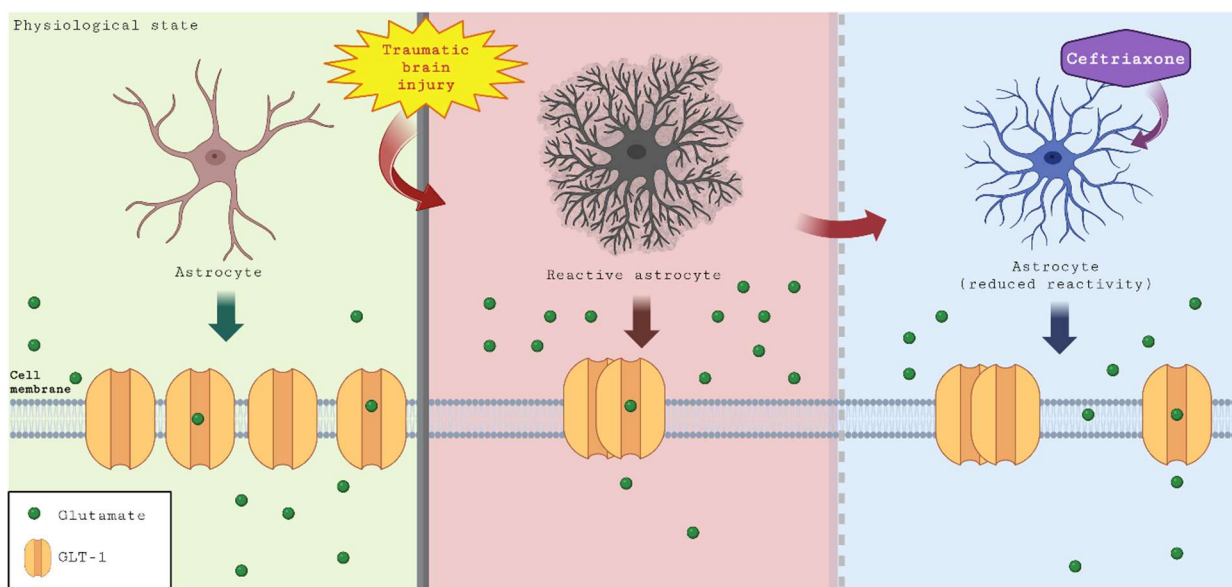


Рис. 3.4. Запропонована концепція кластеризації GLT-1 після лЧМТ. Підвищення позаклітинного глутамату після лЧМТ стимулює міграцію GLT-1 до ділянок із вищою концентрацією медіатора та утворення кластерів. Кластеризація призводить до зниження транспортної функції GLT-1 та порушення глутаматного кліренсу. Цефтріаксон знижує реактивність астрогліальних клітин та запобігає кластеризації GLT-1, відновлюючи його рівномірний розподіл. Схему створено у BioRender (Naumenko, Y., 2026).

3.8. Методологічні обмеження та перспективи

Представлені результати отримані надійними методами і є відтворюваними, проте мають ряд обмежень, що слід враховувати при інтерпретації.

3.8.1. Відсутність функціональних та поведінкових тестів

Дане дослідження є суто гістологічним і не включає вимірювань функціональної активності GLT-1 (наприклад, поглинання радіоактивно міченого глутамату, електрофізіологічних вимірювань синаптичних потенціалів) або поведінкових тестів (водний лабіринт Морріса, тест нового об'єкту, тест відкритого поля). Це означає, що зв'язок між виявленою кластеризацією GLT-1 та

функціональними когнітивними наслідками лЧМТ залишається непрямим і потребує верифікації у майбутніх роботах.

Поведінкові результати були виміряні у попередньому дослідженні нашої лабораторії [16] з частково схожою моделлю, де цефтріаксон знижував показники тривожності травмованих мишей до контрольних значень вже на 3-й день лікування. Проте пряма кореляція між часовими профілями GLT-1-кластеризації та поведінковими показниками — завдання майбутніх досліджень.

3.8.2. Специфічність антитіла та обмеження методу

Як зазначено у розділі методів, використане антитіло (OSE00004W, ThermoFisher Scientific) виявляє загальний клітинний пул GLT-1 без розрізнення поверхневої та внутрішньоклітинної фракцій. Для більш точного визначення функціонально активного GLT-1 на поверхні клітини необхідне застосування методів, що доступні лише у живій тканині (biotinylation assay, живоклітинна мікроскопія з антитілами до позаклітинних епітопів).

Крім того, конфокальна мікроскопія з роздільною здатністю ~200 нм не дозволяє прямо візуалізувати окремі молекули GLT-1 або розрізняти молекулярні кластери (10–50 нм) від оптичних артефактів. Детекція «кластерів» за допомогою пороговання Otsu відображає субмікронні угруповання транспортера, але не є прямим вимірюванням молекулярної кластеризації. Для прямої верифікації молекулярної кластеризації GLT-1 необхідне застосування STORM/PALM-мікроскопії або STED.

3.8.3. Обмеження вибірки та стратегії аналізу

Розмір груп ($n = 5$ тварин на групу) є типовим для подібних імуногістохімічних досліджень лЧМТ, проте є відносно невеликим. Використання FoV (а не окремих клітин) як статистичної одиниці підвищує ефективну кількість спостережень, але не компенсує обмеженої кількості тварин. Формальний апріорний розрахунок потужності не проводився.

Включення лише самців є обмеженням, оскільки статеві відмінності у регуляції GLT-1 після лЧМТ задокументовані [114]. Включення самок до майбутніх досліджень є необхідним для оцінки трансляційної значущості отриманих результатів.

Додатковим обмеженням є використання фіксованої тканини, що унеможлиблює динамічне спостереження за процесами кластеризації та декластеризації GLT-1 *in vivo*. Методи живої візуалізації (двофотонна мікроскопія з генетично кодованими флуоресцентними маркерами GLT-1) могли б надати значно більш детальну інформацію про часову динаміку кластеризації на рівні окремих клітин. Проте ці методи є технічно складнішими та вимагають створення трансгенних тварин з флуоресцентно міченим GLT-1.

Ще одним обмеженням є відсутність кількісної оцінки ступеня реактивного астрогліозу (наприклад, за допомогою вимірювання інтенсивності GFAP-флуоресценції). Хоча якісна оцінка морфології астроцитів надає загальне уявлення про ступінь реактивності, кількісні дані дозволили б провести кореляційний аналіз між ступенем астрогліозу та змінами GLT-1, що могло б додатково підтвердити або спростувати гіпотезу про зв'язок між реактивним фенотипом астроцитів та кластеризацією транспортера.

Обмеженням є також використання лише однієї дози цефтріаксону (250 мг/кг) та одного протоколу введення (5 діб). Дозозалежне дослідження ефекту цефтріаксону на кластеризацію GLT-1 могло б визначити мінімальну ефективну дозу та оптимальну тривалість курсу для досягнення максимального протикластеризаційного ефекту. Крім того, дослідження різних часових вікон початку лікування (наприклад, відстрочене введення через 6, 12 або 24 години після травми) мало б значну трансляційну цінність.

3.8.4. Перспективи подальших досліджень

На основі отриманих результатів визначено наступні пріоритетні напрямки:

1. Вивчення GLT-1-кластеризації та ефекту цефтріаксону в інших регіонах гіпокампу (CA2, CA3, зубчаста звивина) та у неокортексі.

2. Пряме вимірювання функціональної активності GLT-1 (поглинання глутамату) у корелятивних умовах.
3. Додаткові часові точки (1-й день, 21-й день, 28-й день) для повного картування темпоральної динаміки GLT-1-кластеризації та ефекту цефтріаксону.
4. Включення самок до експериментальних груп для оцінки статевих відмінностей.
5. STED або STORM надроздільна мікроскопія для прямої верифікації молекулярної кластеризації GLT-1 на нанометровому рівні.
6. Паралельне поведінкове дослідження для встановлення прямого кореляту між GLT-1-кластеризацією та когнітивним дефіцитом.
7. Дослідження оптимального протоколу цефтріаксону (доза, тривалість, часовий інтервал після травми) для максимізації протикластеризаційного ефекту.

РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. Загальна оцінка отриманих результатів у контексті мети та завдань дослідження

Інтерпретація отриманих результатів вимагає розгляду кількох методологічних аспектів, які можуть впливати на їхню валідність та узагальнюваність. По-перше, використання імунофлуоресценції для кількісної оцінки GLT-1 дає інформацію про імунореактивність транспортера, яка не обов'язково відповідає його функціональній активності. Конформаційні зміни GLT-1 після травми можуть впливати на доступність епітопу для антитіла, що призводить до артефактних змін сигналу. Для підтвердження функціональних наслідків спостережених структурних змін необхідні додаткові дослідження з використанням функціональних методів — мікродіалізу для вимірювання позаклітинного глутамату та електрофізіології для оцінки глутаматних транспортних струмів.

По-друге, конфокальна мікроскопія має обмежену роздільну здатність (приблизно 200 нм латерально, 500 нм аксіально), що не дозволяє розрізнити окремі молекули GLT-1 та визначити, чи є «кластер» у нашому визначенні справжнім молекулярним агрегатом або ж накладанням сигналів від окремих молекул у межах дифракційної межі. Застосування надроздільних методів (STORM, PALM, STED) могло б надати додаткову інформацію про наномасштабну організацію GLT-1 при лЧМТ. По-третє, фіксація тканини параформальдегідом «заморожує» стан клітин на момент перфузії, не відображаючи динамічних процесів, що відбуваються *in vivo*. Дослідження з використанням прижиттєвої двофотонної мікроскопії у трансгенних мишей з флуоресцентно міченим GLT-1 могло б надати інформацію про динаміку кластеризації в реальному часі.

По-четверте, наш аналіз обмежений зоною CA1 дорзального гіпокампу, і результати не можуть бути автоматично екстрапольовані на інші ділянки гіпокампу

(CA3, зубчаста звивина) або інші регіони мозку. Регіональні відмінності в щільності синапсів, астроцитарному покритті, складі позаклітинного матриксу та васкуляризації можуть суттєво впливати на характер змін GLT-1 після лЧМТ. Дослідження GLT-1-кластеризації в інших ділянках мозку є важливим напрямком для розуміння повного спектру когнітивних та емоційних наслідків лЧМТ.

Метою дисертаційної роботи було дослідити зміни розподілу та рівня експресії глутаматного транспортера GLT-1 в астроцитах і пірамідних нейронах CA1 зони гіпокампу мишей після легкої черепно-мозкової травми та оцінити вплив цефтріаксону на ці зміни. Отримані результати не лише відповідають на поставлені завдання, але й відкривають нові напрямки у розумінні патофізіології посттравматичної ексайтотоксичності.

Ключовою знахідкою роботи є демонстрація того, що після лЧМТ GLT-1 не просто зменшується за кількістю, а перерозподіляється у клітині: транспортер концентрується у компактніших, але щільніших угрупованнях (кластерах) замість фізіологічно рівномірного розподілу по мембрані. Цей феномен — GLT-1-кластеризація — спостерігається як в астроцитах, так і в пірамідних нейронах CA1 зони гіпокампу, і є найбільш вираженим у гострому посттравматичному періоді (3-й день). Введення цефтріаксону (250 мг/кг, 5 діб) пригнічує кластеризацію і сприяє відновленню рівномірного розподілу транспортера.

Ці результати мають принципове значення для розуміння механізмів посттравматичної дисфункції глутаматного транспорту: вони свідчать про те, що недостатність GLT-1 при лЧМТ є не лише кількісною, але й якісною, просторовою проблемою. Класичний погляд на зниження GLT-1 при ЧМТ [13, 15] отримує нове пояснення через призму субклітинного перерозподілу транспортера. Відповідно, оцінка потенційних нейропротективних втручань — включаючи цефтріаксон — повинна враховувати не лише рівень GLT-1, але й характер його розподілу.

Цей висновок суттєво змінює концептуальну рамку для вивчення ролі глутаматних транспортерів при ЧМТ. Протягом останніх двох десятиліть домінуючою парадигмою було: лЧМТ знижує рівень GLT-1, що призводить до

накопичення глутамату та ексайтотоксичності. Наші результати додають новий вимір: навіть за частково збереженого рівня GLT-1 його патологічний перерозподіл (кластеризація) може суттєво знижувати ефективність глутаматного кліренсу. Ця «просторова парадигма» доповнює «кількісну парадигму» і відкриває нові можливості для оцінки ефективності терапевтичних втручань.

Практичні наслідки цієї знахідки полягають у тому, що для адекватної оцінки стану GLT-1-системи після лЧМТ необхідно застосовувати методи, що дозволяють аналізувати не лише загальний рівень білка, але й його субклітинний розподіл. Вестерн-блот та ELISA, які є найбільш поширеними методами оцінки рівня GLT-1 у нейробіологічних дослідженнях, не надають інформації про просторовий розподіл транспортера. Імуногістохімія з конфокальною мікроскопією та кількісним аналізом зображень, як використано в нашому дослідженні, забезпечує цю додаткову інформацію.

4.2. Обговорення зміни рівня та кластеризації GLT-1 в астроцитах після лЧМТ

Клінічна трансляція результатів нашого дослідження передбачає подолання кількох суттєвих перешкод. Першою є видоспецифічність фармакокінетики та фармакодинаміки цефтріаксону: доза 250 мг/кг, ефективна у мишей, не може бути безпосередньо перенесена на людину через відмінності у метаболізмі, об'ємі розподілу та проникності через ГЕБ. Алометричний перерахунок дози з миші на людину дає орієнтовну еквівалентну дозу приблизно 20 мг/кг для людини, що значно перевищує стандартну терапевтичну дозу цефтріаксону (1–2 г на добу).

Другою перешкодою є тривалість та режим введення. У нашому дослідженні цефтріаксон вводився протягом 5 днів, починаючи з першої доби після травми. У клінічній практиці пацієнти з лЧМТ можуть звертатися за допомогою через різний час після травми, і «терапевтичне вікно» для ефективності цефтріаксону щодо GLT-1 залишається невизначеним. Дослідження з відстроченим початком

лікування є необхідними для визначення меж цього вікна. Третьою перешкодою є довготривала безпечність застосування цефтріаксону в нейропротективних дозах: антибіотикорезистентність, порушення кишкової мікрофлори та гепатотоксичність є потенційними ускладненнями тривалого застосування бета-лактамічних антибіотиків.

4.2.1. Зниження загального рівня GLT-1 в астроцитах: порівняння з літературою

Зниження загальної флуоресцентної інтенсивності GLT-1 в астроцитах на 56,9% на 3-й день після лЧМТ є значущим і відповідає даним попередніх досліджень. Raghavendra Rao et al. (1998) [13] виявили суттєве зниження рівня GLT-1 та GLAST в іпсилатеральній корі щурів через 6–72 год після ЧМТ методом вестерн-блоту [13]. Goodrich et al. (2013) [15] показали значне зниження GLT-1 на 7-й день після ЧМТ у щурів, і саме цю закономірність вони обрали мішенню для цефтріаксонового лікування [15]. Dorsett et al. (2017) [14] отримали складнішу картину: зміни поглинання глутамату в корі без відповідного зниження рівня білка GLT-1 через 24 год після ЧМТ [14].

Наші дані доповнюють ці результати кількома важливими аспектами. По-перше, ми спостерігаємо зниження GLT-1 у гіпокампі (зона CA1), а не лише в корі — структурі, яка є первинною мішенню при тім'яному ударі. Це підтверджує, що навіть відносно легка дифузна ЧМТ здатна ініціювати порушення астроцитарної функції у дистальних від місця удару структурах мозку. По-друге, на відміну від більшості попередніх досліджень, які вимірювали рівень GLT-1 методом вестерн-блоту (що дає усереднену характеристику по всій тканині), ми проводили просторово-роздільний аналіз у конкретній зоні гіпокампу, що дозволяє виявляти регіон-специфічні патерни розподілу.

Важливим є часовий аспект: у нашому дослідженні зниження рівня GLT-1 виявлено вже на 3-й день після травми, тоді як Goodrich et al. (2013) [15] реєстрували його переважно на 7-й день [15]. Ця розбіжність може бути пов'язана з різницею у використовуваних тваринних моделях (щури vs миші), тяжкості

травми, зоні аналізу (кора vs гіпокамп) та методах вимірювання (вестерн-блот vs флуоресцентна мікроскопія). Вона може також відображати справжні відмінності у кінетиці зниження GLT-1 між різними регіонами мозку та різними видами тварин, що є цікавим предметом для порівняльних досліджень.

4.2.2. Кластеризація GLT-1 в астроцитах як новий феномен при лЧМТ

Найбільш принциповою знахідкою, що відрізняє наше дослідження від попередніх, є виявлення кластеризації GLT-1 в астроцитах після лЧМТ. Підвищення середньої інтенсивності окремих GLT-1-кластерів удвічі при одночасному зниженні загальної флуоресценції вказує на перерозподіл транспортера: замість рівномірного покриття мембрани астроцита GLT-1 концентрується у дискретних ділянках. Цей феномен раніше не описувався в контексті ЧМТ.

Молекулярна основа цього явища, ймовірно, пов'язана з добре задокументованою здатністю GLT-1 до латеральної дифузії в мембрані та субстрат-індукованої кластеризації. Murphy-Royal et al. (2015) [123] продемонстрували, що поверхнева дифузія астроцитарних GLT-1 є динамічним процесом, що безпосередньо визначає ефективність синаптичної передачі: менш рухомі (дифузно розподілені) транспортери асоціюються з підвищеним виходом глутамату із синаптичної щілини [123]. Henneberger et al. (2020) [103] показали, що під час довготривалої потенціації астрогліальні відростки відтягуються від синаптичної щілини, що супроводжується переміщенням GLT-1 і підвищеним виплескуванням глутамату [103].

При лЧМТ іонний дисбаланс значно інтенсивніший, ніж при фізіологічній синаптичній активності. Масивний вихід внутрішньоклітинного калію з деполяризованих нейронів [35] призводить до підвищення позаклітинної концентрації K^+ і деполяризації астроцитів, що може порушувати електрохімічні градієнти, необхідні для нормального функціонування Na^+ -залежного GLT-1. Одночасно, вхід натрію в астроцити може активувати субстрат-індуковану кластеризацію, описану Nakagawa et al. (2008) [86]: при підвищенні

внутрішньоклітинного Na^+ у відповідь на надходження глутамату GLT-1 утворює кластери, переміщаючись з мембрани у субмембранні структури.

Поєднання двох механізмів — аномальної міграції GLT-1 до ділянок підвищеної концентрації глутамату (за аналогією з LTP, але у масштабах дифузної ексайтотоксичності) та субстрат-індукованої кластеризації через іонний дисбаланс — пояснює спостережуваний патерн: GLT-1 не рівномірно «розчиняється» по мембрані, а локально концентрується у місцях максимального глутаматного стресу, утворюючи кластери з підвищеною щільністю молекул.

Функціональний наслідок кластеризації — зниження ефективності зворотного захоплення глутамату — є центральним для нашої концептуальної моделі. Хоча кластеризація теоретично може збільшувати локальну концентрацію транспортерів у ділянці підвищеного глутамату (адаптивна інтерпретація), практичний ефект, ймовірно, є протилежним: кластеризований GLT-1 зменшує загальну площу мембранного покриття, тим самим знижуючи «захисну поверхню» для глутаматного захоплення. На користь патологічної інтерпретації свідчить і те, що цефтріаксон — препарат з відомим позитивним ефектом при ЧМТ [15] — пригнічує кластеризацію, а не посилює її.

4.2.3. Часовий профіль змін GLT-1 в астроцитах та ефект цефтріаксону

Динаміка змін GLT-1 в астроцитах, виявлена у нашому дослідженні, утворює характерний часовий профіль: найбільш виражені зміни (кластеризація + зниження загального рівня) на 3-й день, поступова нормалізація до 7-го та 14-го днів. Цей профіль корелює з природною динамікою посттравматичного нейрозапалення та реактивного астрогліозу.

Реактивний астрогліоз є найбільш вираженим у гострій фазі після ЧМТ (1–3 доби) і поступово знижується протягом 1–2 тижнів [59, 128]. Зміни GLT-1 в астроцитах, очевидно, тісно пов'язані з динамікою астроцитарної реактивності: у реактивному стані астроцити не лише гіпертрофуються, але й перебудовують свою мембранну організацію, що може призводити до перерозподілу GLT-1 у кластери.

Цефтріаксон найсильніше пригнічував кластеризацію на 3-й день — у гострій фазі, — а після завершення 5-денного курсу ефект швидко послаблювався: до 7-го дня різниця за середньою інтенсивністю кластерів опускалась до межі значущості ($p < 0,05$), а за загальним рівнем GLT-1 зникала зовсім ($p > 0,05$). Це свідчить про те, що цефтріаксон не «переналаштовує» стійко GLT-1-систему в астроцитах, а підтримує фізіологічний розподіл транспортера переважно за наявності достатньої концентрації препарату. Водночас повного повернення до «нелікованого» стану не відбувається: відносна площа GLT-1-кластерів у лікованих тварин залишалась достовірно більшою і на 7-й ($p < 0,01$), і на 14-й день ($p < 0,05$). Для розробки клінічних протоколів це означає, що основний терапевтичний ефект є часово обмеженим і потребує підтримки, але короткий курс у гострій фазі лишає по собі певний залишковий слід.

Разом з тим зниження загального рівня GLT-1 в астроцитах після лЧМТ (загальна флуоресцентна інтенсивність) не виявляло статистично значущої відповіді на введення цефтріаксону у жодній із часових точок. Це суперечить деяким попереднім дослідженням, які фіксували підвищення рівня GLT-1 після цефтріаксону при ЧМТ [15, 95]. Можливим поясненням є різниця у методах: вестерн-блот (що вимірює загальну кількість білка у гомогенаті) може виявляти збільшення GLT-1 там, де конфокальна мікроскопія з аналізом флуоресценції його не фіксує — наприклад, якщо підвищення рівня GLT-1 відбувається у глибинних шарах тканини або в інших регіонах, не охоплених нашим FoV. Методологічно ці підходи є взаємодоповнювальними, а не конкурентними.

4.3. Обговорення змін GLT-1 у пірамідних нейронах після лЧМТ

4.3.1. Нейрональна GLT-1 у CA1 гіпокампу: новий погляд на «астроцитарний» транспортер

Виявлення GLT-1 у соматичному відділі пірамідних нейронів CA1 гіпокампу є важливою знахідкою цього дослідження. Попри те, що традиційний погляд

відводить GLT-1 роль виключно астроцитарного транспортера [12], сучасні дані змінюють цю картину. Rimmele and Rosenberg (2016) [80] систематизували дані про наявність GLT-1 у пресинаптичних терміналях збуджувальних аксонів [80]. Chen et al. (2004) [129] показали, що варіант GLT-1a присутній у пресинаптичних терміналях зрілих нейронів гіпокампу [129]. McNair et al. (2019) [121] продемонстрували на мишах з нейрон-специфічною делецією GLT-1, що нейрональна GLT-1 відіграє роль у підтримці синаптичного гомеостазу глутамату та мітохондріальній функції [121].

Rimmele et al. (2021) [122] виявили, що втрата GLT-1 у нейронах спричиняє підвищену вразливість до ексайтотоксичності в гіпокампі — навіть за нормального рівня астроцитарної GLT-1 [122]. Це є принципово важливим для розуміння нашого дослідження: навіть якщо астроцитарна GLT-1 зберігала б нормальний рівень і розподіл після лЧМТ, порушення нейрональної GLT-1 могло б саме по собі ініціювати ексайтотоксичне ушкодження нейронів.

У нашому дослідженні GLT-1-сигнал у соматичному відділі нейронів виявлявся у вигляді чітких флуоресцентних кластерів, рівномірно розподілених по площі пірамідного шару CA1 у контрольних тварин. Ця локалізація може відображати GLT-1 безпосередньо у нейрональній мембрані (периферичний соматичний пул) або транспортер у перисинаптичних терміналях аксонів, що знаходяться у межах досліджуваного шару. Без надроздільної мікроскопії (STED, STORM) однозначне розрізнення цих варіантів неможливе.

Тим не менш, важливим є не стільки точна субклітинна локалізація, скільки факт того, що виявлений GLT-1-сигнал у нейрональному шарі зазнає систематичних змін після лЧМТ та у відповідь на цефтріаксон — паралельних, але не ідентичних змін астроцитарної GLT-1. Це свідчить про те, що нейрональна GLT-1 є не пасивним «відображенням» астроцитарного транспортера, а самостійним регульованим компонентом глутаматного гомеостазу.

Питання про функціональну роль соматичної нейрональної GLT-1 залишається відкритим і є предметом активної дискусії в літературі. На відміну від

пресинаптичної GLT-1, яка бере участь у регуляції синаптичної концентрації глутамату, соматична GLT-1 може виконувати інші функції. Однією з гіпотез є участь соматичної GLT-1 у захисті тіла нейрона від ексайтотоксичності шляхом захоплення глутамату, що дифундує від синаптичних закінчень до сомального відділу. Інша гіпотеза передбачає роль нейрональної GLT-1 у внутрішньоклітинному метаболізмі глутамату та підтримці мітохондріальної функції.

Незалежно від точної функціональної ролі соматичної нейрональної GLT-1, факт її систематичних змін після лЧМТ свідчить про залучення цього білка до посттравматичної відповіді нейронів. Чутливість нейрональної GLT-1 до цефтріаксону підтверджує, що механізм дії антибіотика не обмежується лише астроцитами і що нейрони також є мішенню його нейропротективного ефекту. Це розширює розуміння фармакології цефтріаксону та потенційно збільшує його терапевтичний потенціал.

4.3.2. Кластеризація нейрональної GLT-1 після лЧМТ: механізми та значення

Зменшення відносної площі GLT-1-кластерів у пірамідних нейронах після лЧМТ (3-й день) є кількісним відображенням кластеризації: GLT-1-сигнал концентрується у меншій частині соматичного шару, займаючи меншу площу при збереженій або підвищеній локальній інтенсивності. Зменшення відносної інтенсивності GLT-1-кластерів на 21,3% після лЧМТ свідчить також і про відносне зменшення частки GLT-1, що знаходиться у кластерах, відносно загального нейронального GLT-1.

Механізм кластеризації нейрональної GLT-1 може дещо відрізнятися від астроцитарного. У нейронах роль натрій-залежної субстрат-індукованої кластеризації [86] може бути менш вираженою, оскільки нейрональний GLT-1 за умов фізіологічного стану вже частково розміщений у відносно спеціалізованих ділянках (пресинаптичні терміналі, соматична мембрана). Після лЧМТ кальцієвий приплив у нейрони [130] може активувати кальпаїн та інші протеази, що

порушують цитоскелетні якорі GLT-1 і призводять до його ненормованої дифузії та подальшої агрегації.

Слід також зазначити, що за умов масивної деполяризації нейронів після лЧМТ GLT-1 у нейрональних пресинаптичних терміналях може переходити у зворотний режим транспорту [78], як і астроцитарний GLT-1. Якщо мембранний потенціал нейрона знижується нижче рівноважного потенціалу для механізму транспорту GLT-1, транспортер починає виводити глутамат замість його захоплення. Цей стан «замороженого» або «зворотного» транспортера може асоціюватися із зміненним просторовим розподілом GLT-1, що ми і спостерігаємо.

4.3.3. Відтермінований ефект цефтріаксону на нейрональну GLT-1

Особливо інтригуючим є ефект цефтріаксону на нейрональну GLT-1 на 14-й день після лЧМТ. Хоча курс введення препарату завершувався на 5-й день, у лікованих тварин на 14-й день спостерігалась більш ніж удвічі більша відносна площа GLT-1-кластерів у нейронах порівняно з нелікованими (0,236 vs 0,112, $p < 0,05$). На 7-й день такого ефекту не лише не спостерігалось — співвідношення між групами було зворотним ($p < 0,05$), що виключає просте пролонгування дії препарату.

Ми пропонуємо кілька можливих пояснень цього феномену. По-перше, цефтріаксон на початку посттравматичного відновлення може «перезавантажувати» нейрональну GLT-1-систему, запускаючи програму синтезу та правильного трафікінгу нового GLT-1, ефект якої реалізується відтерміновано. По-друге, знижуючи нейрозапалення та реактивний астрогліоз у перші дні після лЧМТ, цефтріаксон може забезпечувати сприятливіше мікросередовище для нейрональних клітин, що проявляється у поступовому відновленні нейрональної GLT-1 до 14-го дня. По-третє, нейрони, які «вижили» в умовах пом'якшеної цефтріаксоном ексайтотоксичності, можуть демонструвати більш повноцінне відновлення GLT-1-системи до 14-го дня — у той час як у нелікованих тварин частина нейронів залишається у стані субфатальної дисфункції.

Незалежно від механізму, відтермінований ефект цефтріаксону на нейрональну GLT-1 є важливою знахідкою з точки зору нейропротективної стратегії: він свідчить про те, що навіть короткостроковий курс цефтріаксону в гострій фазі лЧМТ може мати довготривалий позитивний вплив на нейрональну GLT-1-систему.

Відтермінований ефект цефтріаксону на нейрональну GLT-1 можна також розглядати в контексті епігенетичної модуляції. Цефтріаксон, активуючи NF- κ B-залежну транскрипцію в гострій фазі лЧМТ, може індукувати зміни в хроматиновій структурі промоторної ділянки гена GLT-1, які зберігаються після припинення фармакологічного стимулу. Ці епігенетичні зміни можуть підтримувати підвищений базальний рівень транскрипції GLT-1 в нейронах протягом днів після завершення курсу, що пояснює виражений ефект на 14-й день.

Альтернативним поясненням є непрямий нейропротективний ефект цефтріаксону: пригнічуючи кластеризацію GLT-1 в астроцитах у гострій фазі, цефтріаксон знижує загальний рівень ексайтотоксичності, що, в свою чергу, зменшує пошкодження нейронів та створює умови для більш ефективного відновлення нейрональної GLT-1-системи у підгострій фазі. Таким чином, ефект цефтріаксону на нейрональну GLT-1 на 14-й день може бути не прямим, а опосередкованим через загальне покращення мікросередовища навколо нейронів.

4.4. GLT-1-кластеризація

Одне з центральних концептуальних питань, поставлених нашим дослідженням, — чи є кластеризація GLT-1 патологічним процесом, що посилює ексайтотоксичність, чи адаптивним механізмом, що намагається протидіяти надлишку глутамату. Це питання не є суто теоретичним: від відповіді на нього залежить інтерпретація ефекту цефтріаксону (профілактика патології vs придушення адаптації) і стратегія терапевтичного впливу на GLT-1.

4.4.1. Аргументи на користь патологічної інтерпретації

По-перше, кластеризований GLT-1 має знижену транспортну ефективність. Nakagawa et al. (2008) [86] продемонстрували, що субстрат-індуковані кластери GLT-1 формуються всередині клітини (а не на мембрані) і є функціонально неактивними [86]. Якщо кластери, що ми спостерігаємо при лЧМТ, відповідають хоча б частково внутрішньоклітинним агрегатам GLT-1, то їх утворення прямо знижує кількість функціонального транспортера на мембрані.

По-друге, цефтріаксон — препарат, показаний як нейропротективний засіб при ЧМТ [15, 96] — пригнічує кластеризацію. Якби кластеризація була адаптивним процесом, очікувалась би нейтральна або негативна дія цефтріаксону на неврологічні результати. Натомість цефтріаксон у GLT-1-нокаутних мишей повністю втрачає нейропротективний ефект [94], що вказує на те, що саме GLT-1-опосередкований механізм є ключовим.

По-третє, у мишей після лЧМТ без лікування спостерігаються виражені поведінкові порушення (підвищена тривожність, рухова гіперактивність) [16], тоді як цефтріаксон, що пригнічує кластеризацію, нормалізує поведінку. Ця непряма кореляція між кластеризацією GLT-1 та функціональними порушеннями підтримує патологічну інтерпретацію.

4.4.2. Аргументи на користь адаптивної інтерпретації

По-перше, концентрація GLT-1 у місцях підвищеної ексайтотоксичності теоретично може збільшувати ефективність локального глутаматного захоплення. Якщо GLT-1 накопичується саме там, де найбільше глутамату, це може частково компенсувати перевантаження синаптичної щілини.

По-друге, деяке зниження загального GLT-1-сигналу може відображати «самозахисний» механізм астроцитів: в умовах надмірного іонного навантаження зменшення кількості Na^+ -залежних транспортерів на мембрані може запобігати надмірному введенню натрію до астроцитів, що могло б призвести до їх набрякання та порушення функції.

По-третє, природна нормалізація кластеризації до 14-го дня після лЧМТ без будь-якого лікування свідчить про те, що організм здатен самотійно «розкластеризувати» GLT-1 — що є аргументом на користь часово-обмеженої адаптивної реакції.

4.4.3. Синтез: кластеризація як спочатку адаптивна, але прогресуюча у патологічну відповідь

Ми пропонуємо синтетичну точку зору: кластеризація GLT-1 при лЧМТ може являти собою початково адаптивну відповідь, що прогресує у патологічну за умов тривалої ексайтотоксичності. У перші хвилини-години після травми концентрація GLT-1 поблизу ділянок підвищеного глутамату може мати адаптивний сенс. Однак із часом та за умов наростаючого іонного дисбалансу кластеризований GLT-1 дедалі більше переходить у функціонально неактивний стан (внутрішньоклітинні агрегати, зворотний режим транспорту), перетворюючись на джерело додаткового ексайтотоксичного навантаження.

Цефтріаксон, запобігаючи кластеризації, може переривати цей перехід від адаптації до патології. Замість концентрації GLT-1 у кластерах — що короткочасно ефективно, але довгостроково шкідливо — цефтріаксон підтримує рівномірний розподіл транспортера, що забезпечує стабільний, хоча й не максимальний, рівень захисту проти ексайтотоксичності протягом усього гострого посттравматичного періоду.

Концепція «адаптивного вікна» кластеризації GLT-1 має важливе значення для визначення оптимального терапевтичного підходу. Якщо кластеризація є початково адаптивною, надто раннє втручання (наприклад, введення цефтріаксону в перші хвилини після травми) теоретично може порушити природний захисний механізм. З іншого боку, надто пізнє втручання може бути менш ефективним через стабілізацію патологічних кластерів та запуск незворотних деградаційних процесів. Оптимальне терапевтичне вікно, ймовірно, припадає на період переходу від адаптивної до патологічної фази кластеризації, що за нашими даними відбувається протягом перших годин-днів після лЧМТ.

Потенціал GLT-1-кластеризації як діагностичного біомаркера лЧМТ заслуговує на окрему увагу. На сьогодні об'єктивна діагностика лЧМТ ускладнена відсутністю специфічних та чутливих біомаркерів. Хоча вимірювання GLT-1-кластеризації *in vivo* поки що неможливе з наявними технологіями, непрямі маркери — такі як рівень GLT-1 у цереброспінальній рідині або плазмі крові — потенційно можуть відображати стан GLT-1-системи в мозку. Дослідження кореляції між плазмовим рівнем GLT-1 та ступенем його кластеризації в тканині мозку могло б стати першим кроком до розробки клінічно доступного біомаркера.

Мультимодальний підхід до біомаркерної діагностики лЧМТ, що поєднує маркери різних патофізіологічних каскадів (нейрональне ушкодження — NSE, UCH-L1; астроцитарна реактивність — GFAP, S100 β ; аксональне ушкодження — NfL; запалення — IL-6, TNF- α) з потенційними маркерами глутаматного транспорту (GLT-1, GLAST), може забезпечити комплексну оцінку тяжкості травми та прогнозування відновлення. Наше дослідження вносить внесок у цю парадигму, демонструючи, що зміни GLT-1 мають специфічну часову динаміку, яка відрізняється від динаміки інших відомих біомаркерів і може надавати додаткову діагностичну інформацію.

Слід також зазначити, що дихотомія «адаптація vs патологія» є спрощенням, і реальний біологічний процес, ймовірно, включає спектр станів між цими двома полюсами. Різні субпопуляції GLT-1-кластерів можуть мати різний функціональний статус: деякі кластери можуть зберігати транспортну активність (адаптивні), тоді як інші можуть бути інтерналізованими та функціонально інертними (патологічні). Гетерогенність кластерів за розміром та інтенсивністю, яку ми спостерігаємо у наших даних, може відображати цю функціональну різноманітність.

Концепція «метапластичності» GLT-1 може бути корисною для інтерпретації наших результатів. Подібно до того, як синаптична метапластичність описує зміну порогу для індукції LTP або LTD залежно від попередньої активності, можна припустити існування «транспортної метапластичності» — стану, при якому

попередній досвід кластеризації GLT-1 змінює чутливість системи до наступних впливів. Якщо після першого епізоду лЧМТ GLT-1-система не повністю відновлюється (що наші дані для 14-го дня підтверджують), повторна травма може спричинити більш виражену та тривалу кластеризацію через знижений «пори́г» дестабілізації. Цей механізм міг би пояснити кумулятивний ефект повторних лЧМТ та прогресуючий характер хронічної травматичної енцефалопатії, а також обґрунтовує необхідність повного відновлення GLT-1-гомеостазу перед поверненням до діяльності з ризиком повторної травми.

4.5. Обговорення впливу цефтріаксону на GLT-1 при лЧМТ у порівнянні з літературою

4.5.1. Первинний механізм дії цефтріаксону: класична та нова точки зору

Відомо, що цефтріаксон підвищує рівень GLT-1 через активацію транскрипційного фактора NF- κ B та SP1-сайтів у промоторі гена GLT-1, збільшуючи рівень мРНК транспортера [92]. Цей «класичний» механізм отримав підтвердження у численних роботах: при ALS [92], епілепсії [131], ішемії [132], при ЧМТ [15, 95]. Він є цілком обґрунтованим і не суперечить нашим результатам.

Наші дані пропонують новий вимір цього механізму: окрім підвищення рівня GLT-1, цефтріаксон впливає на просторовий розподіл транспортера у клітині, пригнічуючи патологічну кластеризацію. Це може відбуватись через кілька шляхів. По-перше, новосинтезований GLT-1 під дією цефтріаксону може включатись у мембрану більш рівномірно, «розбавляючи» кластеризовані молекули та відновлюючи фізіологічний розподіл. По-друге, зниження реактивності астроцитів [120] і нормалізація іонного мікросередовища усуває тригер кластеризації — іонний дисбаланс. По-третє, цефтріаксон може безпосередньо впливати на посттрансляційний трафікінг GLT-1, сприяючи його включенню у мембрану, а не накопиченню у субмембранних структурах.

4.5.2. Специфічність ефекту цефтріаксону щодо пошкоджених ділянок

Goodrich et al. (2013) [15] відзначили, що цефтріаксон підвищує рівень GLT-1 переважно у пошкоджених ділянках мозку, «вирівнюючи» кількість транспортерів між ушкодженими та неушкодженими зонами [15]. Це спостереження важливе, оскільки свідчить про те, що ефект цефтріаксону не є простим глобальним підвищенням синтезу GLT-1, а має цілеспрямований характер — можливо, через активацію NF-κB переважно у запально-активованих клітинах.

Наші дані з цефтріаксонового контролю (без лЧМТ) показують, що цефтріаксон також виявляє ефект на GLT-1 у неушкодженому мозку: підвищення загальної інтенсивності GLT-1 в астроцитах (+19,1%) та відносної інтенсивності і площі GLT-1 у нейронах (+22,8% і +13,5%). Це відповідає даним Rothstein et al. (2005) [92] і свідчить про системну дію препарату. Однак у травмованому мозку ефект цефтріаксону на кластеризацію може мати особливу значущість, оскільки саме кластеризація є специфічним посттравматичним механізмом порушення функції GLT-1.

4.5.3. Відсутність ефекту цефтріаксону на загальний рівень GLT-1 в астроцитах після лЧМТ

Цікавим є спостереження, що цефтріаксон не виявляв статистично значущого впливу на загальну флуоресцентну інтенсивність GLT-1 в астроцитах після лЧМТ (на противагу ефекту на рівень GLT-1 у контрольних тварин). Це може означати, що у посттравматичних умовах «підвищувальний» ефект цефтріаксону на синтез GLT-1 нівелюється трансляційними або посттрансляційними механізмами деградації, яких немає в інтактному мозку.

Така «декупляція» між рівнем синтезу і загальним пулом GLT-1 підкреслює, що посттравматичний мозок є принципово іншим фармакологічним середовищем. В умовах запалення та протеолітичного стресу (кальпаїн, каспази, MMPs) новосинтезований GLT-1 може деградувати швидше, ніж у нормі. Це також є

аргументом на користь концентрації уваги дослідників на розподілі GLT-1, а не лише на його кількості.

4.5.4. Оптимальний протокол введення цефтріаксону: дискусія

Використаний у нашому дослідженні протокол — 250 мг/кг на добу, 5 діб, внутрішньоочеревинно — відповідає протоколам попередніх робіт [15, 95]. Разом з тим різке послаблення ефекту вже на 7-й день після завершення курсу порушує питання: який оптимальний протокол міг би забезпечити пролонгований захист?

Можливі стратегії оптимізації: (1) збільшення тривалості курсу; (2) повторні короткі курси з інтервалами; (3) пролонгована форма вивільнення; (4) комбінація з іншими нейропротекторами, що підтримують фізіологічний стан GLT-1 незалежними механізмами. Однак всі ці підходи потребують ретельного балансування між нейропротективним ефектом і ризиками тривалого застосування антибіотика (резистентність, порушення мікробіому, гепатотоксичність при тривалих курсах у щурів).

Цікавим є також питання щодо терапевтичного вікна — оптимального часу введення цефтріаксону після лЧМТ. У нашому протоколі перша ін'єкція вводилась у день травми, тобто до розвитку повного іонного дисбалансу та ексайтотоксичності. Введення цефтріаксону через 24–48 год після травми (коли ексайтотоксичний каскад вже активований) може мати іншу ефективність. Встановлення оптимального терапевтичного вікна є важливим завданням для майбутніх досліджень.

Питання трансляції протоколу введення цефтріаксону від тваринної моделі до клінічної практики є складним. У мишей період напіввиведення цефтріаксону становить приблизно 1 годину, тоді як у людей — 6–9 годин. Це означає, що еквівалентна клінічна доза має бути суттєво нижчою за тваринну. Проте проникність цефтріаксону через ГЕБ у людей також відрізняється від мишей, що ускладнює простий перерахунок дози. Для визначення оптимальної клінічної дози необхідні фармакокінетичні дослідження з вимірюванням концентрації цефтріаксону в спинномозковій рідині.

Ризик розвитку антибіотикорезистентності при тривалому застосуванні цефтріаксону як нейропротективного агента є серйозним клінічним обмеженням. Цефтріаксон є широко використовуваним антибіотиком для лікування серйозних інфекцій, і його нецільове застосування може сприяти поширенню резистентних штамів бактерій. Тому дослідження спрямовані на ідентифікацію неантибіотичних бета-лактамних сполук, що зберігають здатність підвищувати GLT-1 без антимікробної активності, є перспективним напрямком розвитку цієї терапевтичної стратегії.

Окремим обмеженням нашого дослідження є використання лише самців мишей. Статеві відмінності у відповіді на лЧМТ добре задокументовані і включають різний ступінь нейрозапалення, різну вираженість ексайтотоксичності та різну динаміку відновлення. Естрогени мають доведений нейропротективний ефект через модуляцію GLT-1 — 17β -естрадіол підвищує експресію GLT-1 через естрогенні рецептори альфа та активацію промотора гена SLC1A2. Тому результати нашого дослідження не можуть бути автоматично екстрапольовані на самок, і дослідження статевих відмінностей у відповіді GLT-1 на лЧМТ та цефтріаксон є необхідним напрямком подальших робіт.

Вікові аспекти також заслуговують на увагу. Наше дослідження проведено на молодих дорослих мишах, тоді як лЧМТ в людській популяції вражає всі вікові групи. Вікові зміни експресії GLT-1, щільності синапсів, астроцитарної реактивності та здатності до нейрорегенерації можуть суттєво модифікувати як патофізіологічну відповідь на лЧМТ, так і ефективність нейропротективного лікування. Зокрема, у літніх тварин базальний рівень GLT-1 є зниженим, а здатність до його індукції — обмеженою, що може зменшувати ефективність цефтріаксону. Дослідження вікової залежності ефекту цефтріаксону на GLT-1 при лЧМТ є важливим для визначення оптимальних терапевтичних стратегій для різних вікових груп.

4.6. GLT-1 при лЧМТ у контексті інших нейрологічних патологій

Дисрегуляція GLT-1 виявлена при широкому спектрі нейрологічних та психічних розладів. Розміщення наших результатів у цей ширший контекст дозволяє краще зрозуміти механізм посттравматичної дисфункції транспортера та оцінити потенціал терапевтичного впливу.

4.6.1. GLT-1 при ішемічному інсульті: паралелі з лЧМТ

Ішемічний інсульт і лЧМТ мають суттєві патофізіологічні паралелі в контексті глутаматного транспорту. Mitani and Tanaka (2003) [78] показали, що під час ішемії GLT-1 переходить у зворотний режим транспорту [78], що є безпосереднім аналогом описаного нами механізму при іонному дисбалансі після лЧМТ. Huang et al. (2019) [91] продемонстрували, що підвищення рівня астроцитарного GLT-1 за допомогою miR-124 зменшує ішемічне ушкодження [91].

Tejeda-Bayron et al. (2021) [114] виявили статеві відмінності у нейропротективному ефекті активації GLT-1 при інсульті: позитивний ефект спостерігався у самців, але не у самок [114]. Ця знахідка є прямо релевантною для нашого дослідження, яке обмежувалось самцями. Вона підкреслює важливість включення обох статей у майбутні дослідження GLT-1 при лЧМТ. Wang and Harvey (2016) [132] розглядали підвищення GLT-1 як терапевтичний підхід при інсульті [132], що концептуально збігається з нашими даними щодо цефтріаксону при лЧМТ.

Суттєвою відмінністю між ішемією та лЧМТ у контексті GLT-1 є тяжкість і локалізація іонного дисбалансу: при вогнищевому інсульті повне виснаження АТФ в ішемічному ядрі призводить до незворотного переходу GLT-1 у зворотний режим; при лЧМТ іонний дисбаланс є відносно помірним і поширеним по всьому мозку (дифузний характер травми). Це може пояснювати, чому при лЧМТ ми спостерігаємо переважно кластеризацію GLT-1 (частково зворотний процес), а не масивний зворотний транспорт, характерний для ішемії.

4.6.2. GLT-1 при нейродегенеративних захворюваннях

Зв'язок між лЧМТ та підвищеним ризиком нейродегенеративних захворювань — хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хронічної травматичної енцефалопатії — є добре задокументованим [133, 134]. GLT-1 може бути ланкою, що пов'язує посттравматичні зміни із нейродегенеративним каскадом.

При хворобі Альцгеймера рівень GLT-1 знижений у ділянках з вираженим нейродегенеративним процесом (гіпокамп, скронева кора). Gao et al. (2020) [94] показали, що у трансгенних мишей APP/PS1 (модель АХ) цефтріаксон підвищує рівень GLT-1 та покращує когнітивні функції, причому ефект залежить від наявності GLT-1 [94]. Це концептуально узгоджується з нашими даними: якщо посттравматична кластеризація GLT-1 не буде своєчасно скоригована, хронічний дефіцит глутаматного кліренсу може ініціювати або прискорювати нейродегенеративний каскад.

При хворобі Паркінсона ексайтотоксичність через NMDA-рецептори у чорній субстанції є частиною патологічного процесу. Регуляція GLT-1 у гіпокампі при лЧМТ може опосередковано впливати на ризик пізньої нейродегенерації через зміну реактивності нейронних мереж та синаптичної пластичності — хоча прямий механізм цього зв'язку потребує подальшого вивчення.

Зв'язок між лЧМТ та нейродегенеративними захворюваннями є предметом активного дослідження, і наші результати додають нові аспекти до цієї дискусії. Якщо кластеризація GLT-1 є персистуючим наслідком навіть поодинокі лЧМТ (що наші дані для 14-го дня підтверджують), то хронічне порушення глутаматного кліренсу може створювати умови для поступового накопичення ексайтотоксичного ушкодження, яке з часом може маніфестуватись як нейродегенеративне захворювання.

Хронічна травматична енцефалопатія, яка асоціюється з повторними лЧМТ, характеризується прогресуючим накопиченням гіперфосфорильованого тау-білка та нейрофібрилярних клубків. Ексайтотоксичність через NMDA-рецептори активує кінази (GSK-3 β , CDK5), що фосфорилують тау-білок. Таким чином, порушення

GLT-1-залежного глутаматного кліренсу може бути ланкою між лЧМТ та тауопатією. Цефтріаксон, відновлюючи функціональний розподіл GLT-1, теоретично може знижувати ризик довготривалих нейродегенеративних наслідків лЧМТ, хоча ця гіпотеза потребує перевірки в довготривалих експериментальних дослідженнях.

4.6.3. GLT-1 при психіатричних розладах, пов'язаних з лЧМТ

лЧМТ підвищує ризик депресії, тривожного розладу, ПТСР та суїцидальних думок [8, 9]. Цікаво, що Jia et al. (2020) [90] показали, що дефіцит GLT-1 в астроцитах призводить до зниження тривожності та депресивних ознак у мишей [90], тоді як ми реєструємо зниження функціональної активності GLT-1 після лЧМТ — що, парадоксально, може відповідати спостережуваним поведінковим змінам. Цей парадокс може пояснюватись тим, що GLT-1-дефіцит у різних системах (лімбічна vs кортикальна) справляє різний поведінковий ефект.

Зниження GLT-1 в гіпокампі після лЧМТ може порушувати глутаматергічну регуляцію гіпокампально-кортикальних і гіпокампально-амигдалярних зв'язків, що впливають на обробку емоцій та пам'яті. Цефтріаксон, нормалізуючи GLT-1-систему, може опосередковано впливати на ці зв'язки, що узгоджується з описаним у нашій попередній роботі [16] позитивним ефектом на поведінкові показники травмованих мишей.

4.7. Порушення гематоенцефалічного бар'єру та його вплив на функцію GLT-1

Порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) є одним із ключових наслідків ЧМТ будь-якого ступеня тяжкості. У мозку, де ГЕБ порушений, GLT-1 змушений функціонувати в принципово зміненому молекулярному мікросередовищі, що суттєво впливає на його функцію незалежно від змін рівня або розподілу транспортера.

4.7.1. Неексайтаторні амінокислоти як субстрати зворотного GLT-1-транспорту

Nagos et al. (2019) [135] систематизували роль мембранних транспортерів у патофізіології ЧМТ, підкреслюючи, що GLT-1 є важливим учасником транспортних змін у посттравматичному мозку [135]. В умовах порушення ГЕБ амінокислоти з крові — L-аланін, гліцин, L-глутамін, L-серин — надходять до мозку в концентраціях, що значно перевищують фізіологічні [125].

Ці амінокислоти є субстратами для гетерообміну через GLT-1: потрапляючи в астроцити по градієнту концентрації через GLT-1, вони можуть витіснити глутамат у зворотному напрямку. Carretero et al. (2025) [125] показали, що в умовах локальної гіпоксії — яка є типовим супутником лЧМТ — неексайтаторні амінокислоти з кровоносних судин спричиняють клітинне набухання та синаптичну дисрегуляцію [125]. Цей механізм може додатково знижувати ефективність GLT-1-опосередкованого кліренсу глутамату навіть при збереженому рівні транспортера.

4.7.2. Гіпоксичне мікросередовище та GLT-1

Локальна гіпоксія в ушкоджених ділянках мозку після лЧМТ — наслідок порушення мікроциркуляції та трифазної відповіді церебрального кровотоку [136] — знижує доступність АТФ. Оскільки GLT-1 є вторинно-активним транспортером, що залежить від $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$, будь-яке обмеження АТФ знижує ефективну транспортну ємність GLT-1, навіть якщо кількість молекул транспортера на мембрані залишається незмінною.

Гіпоксичне мікросередовище після лЧМТ характеризується не лише зниженням парціального тиску кисню, але й зміною рН та накопиченням лактату. Ацидоз, що виникає внаслідок анаеробного гліколізу, може безпосередньо впливати на конформацію та активність GLT-1, оскільки транспортний цикл GLT-1 включає котранспорт протона. Зниження рН зсуває рівновагу транспортного

циклу та може знижувати швидкість захоплення глутамату, навіть за збереженої кількості та правильного розподілу транспортера.

Трифазна відповідь церебрального кровотоку після лЧМТ (початкове зниження → гіперперфузія → тривала гіпоперфузія) створює динамічне мікросередовище, в якому умови для функціонування GLT-1 постійно змінюються. У фазі гіпоперфузії (яка може тривати кілька днів після лЧМТ) зниження доставки кисню та глюкози обмежує продукцію АТФ та, відповідно, підтримку іонних градієнтів, необхідних для роботи GLT-1. Ця фаза збігається з періодом максимальної кластеризації GLT-1 у нашому дослідженні (3–7 днів), що підтверджує зв'язок між енергетичним станом тканини та розподілом транспортера.

Таким чином, при лЧМТ функціональна недостатність GLT-1 є результатом щонайменше трьох незалежних механізмів: (1) зниження рівня GLT-1; (2) кластеризація GLT-1; (3) зниження ефективності транспорту через енергетичний дефіцит та молекулярне мікросередовище порушеного ГЕБ. Жоден з цих механізмів не є самодостатнім, і їх синергія у сукупності визначає тяжкість посттравматичної ексайтотоксичності та нейронального ушкодження. Цефтріаксон, впливаючи переважно на перший та другий механізми, не усуває третього — що може пояснювати, чому навіть після лікування цефтріаксоном рівень GLT-1 та поведінкові показники не досягають повного відновлення до контрольних значень.

4.8. Нейрони та астроцити: різні ролі GLT-1 у посттравматичній нейропротекції

4.8.1. Глутаматний цикл і взаємодія нейрон–астроцит після лЧМТ

Функціонування GLT-1 нерозривно пов'язане із взаємодією нейронів та астроцитів у рамках глутаматного циклу. В нормі виділений нейронами глутамат захоплюється астроцитами через GLT-1 (переважно) та GLAST, перетворюється у

глутамін глутамінсинтазою і повертається у нейрони [12]. Після лЧМТ цей цикл порушується на кількох рівнях: надмірне вивільнення глутамату нейронами, зниження рівня GLT-1 та його кластеризація в астроцитах, кластеризація нейрональної GLT-1.

Важливим є той факт, що нейрональні фактори регулюють рівень GLT-1 на поверхні астроцитів [81]. У пошкодженому мозку загибель або дисфункція нейронів може зменшувати нейрональний сигнал, необхідний для підтримки нормального рівня GLT-1 в астроцитах. Це утворює ще один порочний цикл: пошкоджені нейрони → зниження індуктивного сигналу для астроцитарного GLT-1 → знижений GLT-1 в астроцитах → більше позаклітинного глутамату → більше ексайтотоксичного ушкодження нейронів.

Цефтріаксон, підвищуючи транскрипцію GLT-1 незалежно від нейрональних сигналів (через NF-κB [92]), може частково обходити цей порочний цикл — «примусово» підтримуючи рівень GLT-1 в астроцитах навіть за умов зниженого нейронального індуктивного сигналу.

Порушення глутаматного циклу після лЧМТ має каскадні наслідки, що виходять за межі безпосередньої ексайтотоксичності. Зниження захоплення глутамату астроцитами призводить до зменшення продукції глутаміну, що є основним попередником для ресинтезу глутамату в нейронах. Це може спричиняти виснаження нейронального пулу глутамату в довготривалій перспективі та порушувати нормальну синаптичну передачу навіть після зниження гострої ексайтотоксичності. Відновлення нормального функціонування GLT-1 є, таким чином, необхідною умовою не лише для зниження ексайтотоксичності, але й для відновлення нормального глутаматного циклу.

Взаємодія між нейронами та астроцитами після лЧМТ ускладнюється також змінами в калієвому гомеостазі. Астроцитарний GLT-1 є не лише глутаматним, але й калієвим сенсором: підвищення позаклітинного калію стимулює зворотний транспорт глутамату через GLT-1. При лЧМТ масивний вихід калію з деполяризованих нейронів може активувати зворотний режим GLT-1 в астроцитах,

перетворюючи їх із захоплювачів глутамату на його додаткове джерело. Цей порочний цикл (калій $\rightarrow$ зворотний GLT-1 $\rightarrow$ глутамат $\rightarrow$ ексайтотоксичність $\rightarrow$ більше калію) може суттєво посилювати гостре ушкодження мозку.

4.8.2. Реактивний астрогліоз та GLT-1: складний взаємозв'язок

Реактивний астрогліоз після лЧМТ є двозначним феноменом: він одночасно є маркером нейрозапалення і захисною реакцією, спрямованою на обмеження зони ушкодження [59]. У контексті GLT-1 реактивні астроцити виявляють знижену транспортну ефективність: дослідження виявили, що рівень функціонального GLT-1 у реактивних астроцитах може бути нижчим, ніж у спокійних клітинах, попри підвищений загальний синтез деяких мембранних білків [59].

Хоча у нашому дослідженні ми не вимірювали безпосередньо рівень GFAP або ступінь астрогліозу (окрім якісної оцінки морфології), виражена гіпертрофія астроцитів на 3-й день після лЧМТ є надійним маркером реактивного стану [59]. Виявлена нами кластеризація GLT-1 саме на 3-й день — у піку реактивного астрогліозу — може бути функціонально пов'язана зі змінами мембранної організації в реактивних астроцитах. Повернення кластеризації до контрольного рівня до 14-го дня корелює з нормалізацією астроцитарної морфології.

Фенотипічна гетерогенність реактивних астроцитів є важливим аспектом, що може впливати на інтерпретацію наших результатів. Сучасні дослідження виділяють щонайменше два типи реактивних астроцитів: A1 (нейротоксичні, індуковані активованою мікроглією) та A2 (нейропротективні, індуковані ішемією). При ЧМТ обидва фенотипи можуть бути присутніми одночасно в різних пропорціях. Важливо, що A1 та A2 астроцити можуть мати різний рівень експресії та розподіл GLT-1, що може вносити додаткову варіабельність у наші дані.

Реактивний астрогліоз також впливає на просторову організацію астроцитарних доменів. У нормі кожен астроцит займає унікальну територію з мінімальним перекриттям з сусідніми клітинами. При реактивному астрогліозі ця доменна організація порушується: астроцити збільшуються в розмірах, їхні відростки подовжуються та перетинають межі сусідніх доменів. Це може впливати

на ефективність глутаматного кліренсу не лише через зміни в кількості та розподілі GLT-1, але й через порушення просторової організації зон відповідальності окремих астроцитів.

4.8.3. Нейрональна GLT-1 як нова ціль терапії лЧМТ

Наше дослідження вперше демонструє, що нейрональна GLT-1 у соматичному відділі пірамідних нейронів є активним учасником посттравматичної відповіді: вона зазнає кластеризації після лЧМТ і відповідає на цефтріаксон — навіть демонструючи відтермінований ефект на 14-й день. Це відкриває нейрональну GLT-1 як потенційно недооцінену терапевтичну мішень при лЧМТ.

Rimmele et al. (2021) [122] показали, що нейрон-специфічний делеція GLT-1 у мишах призводить до підвищеної вразливості гіпокампу до ексайтотоксичності [122]. Якщо кластеризація нейрональної GLT-1 призводить до подібного функціонального ефекту — зниження ефективності локального захоплення глутамату поблизу синаптичних структур — то корекція нейрональної GLT-1 може мати самостійне нейропротективне значення, доповнюючи ефект відновлення астроцитарної GLT-1.

Розробка терапевтичних стратегій, спрямованих на нейрональну GLT-1, потребує кращого розуміння відмінностей у регуляції GLT-1 між нейронами та астроцитами. Якщо механізми транскрипційної регуляції є спільними (NF-κB-залежний промотор), то посттрансляційна регуляція — фосфорилювання, убіквітинілювання, мембранний трафікінг — може суттєво відрізнятися. Ідентифікація нейрон-специфічних регуляторних механізмів GLT-1 може відкрити шлях до розробки клітинно-селективних нейропротективних засобів.

Клінічне значення нейрональної GLT-1 при лЧМТ може бути навіть вищим, ніж її відносний внесок у загальний глутаматний кліренс. Оскільки нейрони є кінцевими мішенями ексайтотоксичності, наявність GLT-1 безпосередньо на їхній мембрані забезпечує «першу лінію захисту» від надмірного глутамату. Порушення цієї лінії захисту через кластеризацію може бути критичним фактором у визначенні нейрональної виживаності. Відновлення нейрональної GLT-1 цефтріаксоном може

безпосередньо підвищувати стійкість нейронів до ексайтотоксичності, незалежно від стану астроцитарної GLT-1-системи.

4.9. Методологічні аспекти та ключові обмеження

4.9.1. Обмеження флуоресцентної мікроскопії для оцінки GLT-1

Методологія нашого дослідження базується на конфокальній лазерній скануючій мікроскопії з флуоресцентною імуногістохімією. Цей метод має принципово важливі обмеження для оцінки GLT-1-кластеризації.

Роздільна здатність конфокальної мікроскопії (~200 нм латерально, ~500 нм аксіально) є достатньою для виявлення субмікронних GLT-1-кластерів (100–500 нм), але не дозволяє розрізняти окремі молекули GLT-1 (~20 нм) або молекулярні комплекси транспортерів (~10–30 нм). Тому «кластери», виявлені у нашому дослідженні, являють собою оптичні угруповання флуоресцентного сигналу на рівні ~100–500 нм, які можуть включати від кількох до сотень молекул GLT-1.

Для прямої верифікації молекулярної кластеризації GLT-1 на нанометровому рівні необхідне застосування надроздільних методів мікроскопії: STORM (stochastic optical reconstruction microscopy), PALM (photoactivated localization microscopy) або STED (stimulated emission depletion microscopy). Ці методи дозволяють виявляти кластери з роздільною здатністю до 20–50 нм і підтвердити або спростувати молекулярну природу спостережуваної нами кластеризації.

4.9.2. Обмеження, пов'язані зі специфічністю антитіла

Антитіло OSE00004W (ThermoFisher Scientific) розпізнає позаклітинний домен GLT-1 і теоретично може виявляти лише GLT-1, включений у мембрану з орієнтацією активного сайту назовні. Однак у фіксованій тканині з тритон-пермеабілізацією (використаний нами протокол включає 0,3% Triton X-100) клітинні мембрани стають проникними для антитіл, що дозволяє їм зв'язуватись і з внутрішньоклітинними формами GLT-1, де позаклітинний домен доступний через

пермеабілізовану мембрану. Таким чином, загальний GLT-1-пул у нашому дослідженні включає і мембранні, і внутрішньоклітинні форми.

Gao et al. (2020) [94] у своєму дослідженні використовували ті ж принципи фіксованої тканини [94], що свідчить про стандартність цього методологічного підходу в галузі. Хоча ізолювання мембранного від внутрішньоклітинного пулу GLT-1 у фіксованій тканині є складним завданням, порівняльний аналіз між групами залишається валідним: всі групи піддавались однаковій процедурі фіксації та фарбування, що забезпечує порівнюваність вимірювань.

4.9.3. Ліміти порогового аналізу Otsu

Для детекції GLT-1-кластерів у нашому дослідженні використовувалось локальне порогоування Otsu — адаптивний метод, що автоматично визначає поріг сегментації на основі розподілу інтенсивностей у FoV. Переваги цього методу: адаптивність до варіабельності базового сигналу між зразками, відтворюваність (автоматизація), незалежність від суб'єктивного вибору порогу.

Обмеження: метод оптимізований для бімодального розподілу інтенсивностей (кластер vs фон), що може бути неідеальним при змішаному розподілі сигналів. Кластери дуже малої або дуже великої інтенсивності можуть або не детектуватись, або зливатись у один великий об'єкт. Варіабельність між FoV може впливати на ефективний поріг навіть у межах однієї групи. Незважаючи на ці обмеження, метод є відтворюваним і застосований однаково до всіх груп, що забезпечує внутрішню узгодженість порівнянь.

Для мінімізації впливу обмежень порогового аналізу Otsu на наші результати ми застосували кілька стратегій контролю якості. По-перше, візуальна верифікація результатів сегментації проводилась для кожного поля зору з метою виявлення очевидних помилок детекції. По-друге, порівняння з ручною сегментацією на підвибірці зображень підтвердило адекватність автоматичного порогоування. По-третє, аналіз розподілу розмірів детектованих кластерів не виявив систематичних відмінностей між групами, що свідчить про відсутність групо-залежних артефактів сегментації.

Альтернативні підходи до детекції кластерів, такі як машинне навчання (згорткові нейронні мережі) або байєсівська сегментація, могли б потенційно забезпечити вищу точність, особливо для кластерів із неоднорідною інтенсивністю. Проте ці методи вимагають значних навчальних наборів даних з ручною анотацією, які на момент дослідження не були доступні. Крім того, використання простішого та більш інтерпретабельного методу (Otsu) забезпечує прозорість аналізу та полегшує відтворюваність іншими лабораторіями.

4.9.4. Відсутність функціональних вимірювань глутаматного транспорту

Ключовим обмеженням дослідження є відсутність прямих вимірювань функціональної активності GLT-1. Тоді як зміни розподілу та рівня GLT-1, описані нами, є структурними кореляторами функціональних змін, вони не є прямими доказами порушення або відновлення транспортної здатності. Для встановлення функціональних наслідків кластеризації необхідне застосування методів: (1) поглинання міченого ^{14}C -глутамату або D-3H-аспартату синаптосомами або зрізами тканини; (2) бухтингу мітки з використанням інгібіторів GLT-1 (DHK); (3) електрофізіологічних записів глутаматних EPSP у зрізах гіпокампу; (4) живоклітинної флуоресцентної мікроскопії з сенсорами глутамату (iGluSnFR) у культурах або гострих зрізах гіпокампу.

Ці методи є технічно складнішими, але необхідними для перетворення структурних (клітинно-біологічних) спостережень нашого дослідження на функціональні (нейрофізіологічні) докази.

Серед функціональних методів, що могли б доповнити наші структурні дані, найбільш інформативними є: (1) вимірювання поглинання радіоактивно міченого глутамату (^3H -глутамат) на синаптосомальних та астроцитарних препаратах — класичний метод оцінки транспортної активності GLT-1; (2) електрофізіологічне вимірювання синаптичних транспортерних струмів за допомогою патч-клампу на астроцитах — дозволяє оцінити активність GLT-1 на рівні окремої клітини; (3) глутаматні біосенсиори (наприклад, iGluSnFR) — генетично кодовані

флуоресцентні індикатори, що дозволяють візуалізувати динаміку позаклітинного глутамату в реальному часі *in vivo*.

Кореляція між структурними та функціональними даними є ключовим наступним кроком для підтвердження гіпотези про те, що кластеризація GLT-1 знижує ефективність глутаматного кліренсу. Ідеальний експеримент мав би включати одночасне вимірювання просторового розподілу GLT-1 (нашим методом) та функціональної активності транспортера (одним із згаданих методів) на одних і тих самих зразках або тваринах, що дозволило б безпосередньо оцінити функціональні наслідки кластеризації.

Інтеграція результатів нашого дослідження з даними інших лабораторій дозволяє сформулювати уточнену модель посттравматичної дисрегуляції глутаматного транспорту в гіпокампі. Згідно з цією моделлю, первинне механічне ушкодження порушує цитоскелетну організацію астроцитарних та нейрональних мембран, що призводить до латеральної міграції GLT-1 та його агрегації в кластери. Одночасно активація кальпаїнів та каспаз спричиняє протеолітичну деградацію частини мембранного GLT-1, знижуючи його загальний рівень. Нейрозапалення, оксидативний стрес та енергетичний дефіцит підтримують цей стан протягом гострого періоду.

Ця модель пояснює, чому відновлення загального рівня GLT-1 не завжди супроводжується відновленням його функціональної ефективності — навіть при адекватній кількості транспортера його нерівномірний розподіл обмежує просторове покриття синаптичних ділянок. Модель також пояснює механізм дії цефтріаксону: підвищуючи транскрипцію GLT-1 через NF-κB, цефтріаксон збільшує пул новосинтезованого транспортера, який включається в мембрану у дифузному стані, поступово «розбавляючи» кластери і відновлюючи рівномірне покриття. Ця інтерпретація підтверджується нашими даними про переважне збільшення площі кластерів під впливом цефтріаксону.

4.10. Значення результатів для розуміння патофізіології лЧМТ та розробки нейропротективних стратегій

4.10.1. Переосмислення «зниження GLT-1» при ЧМТ: від кількісної до просторової парадигми

Традиційний погляд на порушення GLT-1 при ЧМТ зосереджений на кількісному зниженні рівня транспортера: менше GLT-1 → менший кліренс глутамату → більша ексайтотоксичність [13, 15]. Наші результати пропонують переосмислення цієї парадигми: проблема не лише в кількості GLT-1, але й у його просторовій організації. GLT-1, який кластеризується, є функціонально менш ефективним навіть при збереженому рівні, тоді як рівномірно розподілений GLT-1 (як у контролі та після цефтріаксону) здатен забезпечувати більш ефективний кліренс глутамату з меншою абсолютною кількістю транспортерів.

Цей перехід від кількісної до просторово-функціональної парадигми має важливі наслідки для оцінки ефективності нейропротективних стратегій: вимірювання рівня GLT-1 (вестерн-блот, ELISA, RT-qPCR) є необхідним, але недостатнім інструментом. Повноцінна оцінка вимагає аналізу просторового розподілу транспортера — наприклад, методами, подібними до використаного в нашому дослідженні, або надроздільною мікроскопією.

4.10.2. Цефтріаксон у клінічному контексті

Цефтріаксон є широко доступним, добре вивченим та відносно безпечним антибіотиком, що робить його привабливим кандидатом для репозиціонування як нейропротективного агента. Rothstein et al. (2005) [92] показали його ефективність на тваринних моделях ALS [92]; Goodrich et al. (2013) [15] — при ЧМТ [15]; наші дані поглиблюють механістичне розуміння цього нейропротективного ефекту.

Однак між доклінічними даними та клінічним застосуванням існує значний розрив. Клінічне випробування цефтріахону при ALS (NCT01632475) не показало значущого поліпшення у людей, попри обнадійливі доклінічні результати. Це нагадує про обережність при екстраполяції тваринних даних. При ЧМТ ситуація

може бути іншою: на відміну від ALS (хронічне прогресуюче захворювання), лЧМТ є гострою травмою, де короткостроковий курс цефтріаксону у критичному вікні (1–5 діб після травми) може мати принципово інший терапевтичний потенціал.

Важливим є також питання трансляції між видами: щури і миші, що демонструють чіткий ефект цефтріаксону на GLT-1, мають іншу фармакокінетику та гематоенцефалічний бар'єр, ніж люди. Встановлення еквівалентної терапевтичної дози для людини, терапевтичного вікна та оптимальної тривалості курсу потребує поетапних досліджень — від більш складних тваринних моделей до пілотних клінічних досліджень.

4.10.3. Гіпокамп та GLT-1 у контексті когнітивних наслідків лЧМТ

Вибір гіпокампу як об'єкта дослідження обумовлений не лише методологічними, але й клінічними міркуваннями: порушення пам'яті, просторової навігації та емоційного процесингу є провідними когнітивними скаргами пацієнтів після лЧМТ і прямо пов'язані з дисфункцією гіпокампальних кіл [98, 99].

Зниження GLT-1 у гіпокампі після лЧМТ може порушувати синаптичну пластичність через надмірний вихід глутамату з синаптичної щілини та активацію «неправильних» позасинаптичних NMDA-рецепторів, що асоційовано з пошкодженням, а не із формуванням LTP [73]. Кластеризація GLT-1 поблизу синаптичних ділянок — якщо вона відбувається там, де ми її спостерігаємо — може функціонально моделювати стан GLT-1-дефіциту саме у критичний момент синаптичної передачі.

Відновлення рівномірного розподілу GLT-1 цефтріаксоном може відповідно нормалізувати синаптичну обробку інформації в гіпокампі, що є механістичним поясненням покращення поведінкових показників у лікованих тварин [16]. Перевірка цього зв'язку шляхом паралельного вимірювання LTP у зрізах гіпокампу та розподілу GLT-1 є пріоритетним завданням майбутніх досліджень.

Когнітивні наслідки лЧМТ є комплексними і включають порушення різних доменів: епізодичної пам'яті (залежної від гіпокампу), робочої пам'яті (залежної від

префронтальної кори), швидкості обробки інформації та виконавчих функцій. Хоча наше дослідження зосереджене на гіпокампі, GLT-1 експресується в усіх ділянках мозку, і його дисрегуляція після лЧМТ може охоплювати множинні регіони. Дослідження GLT-1-кластеризації в інших ділянках мозку (префронтальна кора, мигдалина, мозочок) є важливим напрямком для розуміння повного спектру когнітивних та емоційних наслідків лЧМТ.

Тривалість когнітивних порушень після лЧМТ варіює від днів до місяців, а в деяких випадках — років. Персистенція кластеризації GLT-1 на 14-й день після лЧМТ (особливо в нейронах) може бути структурним корелятом тривалих когнітивних скарг пацієнтів з лЧМТ. Якщо ця гіпотеза підтвердиться в подальших дослідженнях, GLT-1-кластеризація може стати потенційним біомаркером тривалості та тяжкості когнітивних наслідків лЧМТ, а її нормалізація — показником ефективності нейропротективного лікування.

4.11. Наукова новизна та місце роботи у загальному контексті дослідження лЧМТ

Дисертаційна робота робить кілька оригінальних внесків у область нейробіології лЧМТ та глутаматного транспорту.

Вперше описано кластеризацію GLT-1 як специфічний посттравматичний феномен. Попри численні роботи щодо зниження рівня GLT-1 при ЧМТ [13, 14, 15, 95], просторовий перерозподіл транспортера в астроцитах і нейронах гіпокампу після лЧМТ раніше не досліджувався [119]. Поєднання підвищення середньої інтенсивності кластерів із зниженням загальної інтенсивності є специфічним патерном, що дозволяє говорити про «кластеризацію» як самостійний феномен.

Вперше показано нейрональну GLT-1 у соматичному відділі пірамідних нейронів CA1 в умовах лЧМТ. Хоча нейрональна GLT-1 у пресинаптичних терміналях описана [129, 83], соматична локалізація у контексті лЧМТ не

вивчалась. Наші дані відкривають нейрон як нову клітинну мішень для GLT-1-опосередкованих терапевтичних стратегій.

Вперше продемонстровано вплив цефтріаксону на просторовий розподіл GLT-1 (антикластеризаційний ефект). Відомий нейропротективний ефект цефтріаксону обумовлювався переважно підвищенням рівня GLT-1 [92, 15]. Наші дані свідчать, що цефтріаксон також нормалізує розподіл транспортера — новий вимір його механізму дії.

Застосовано оригінальну методологію напівавтоматичного аналізу GLT-1-розподілу. Розроблений плагін для Napari [118] для кількісного аналізу GLT-1-кластерів у конфокальних зображеннях, опублікований у відкритому доступі, може застосовуватись у майбутніх дослідженнях GLT-1 та інших мембранних білків.

Разом ці внески формують нову концептуальну рамку для розуміння посттравматичної дисфункції GLT-1: від «менше GLT-1 → менше захоплення» до «GLT-1 перерозподіляється і кластеризується → знижена функціональна ефективність незалежно від кількості». Ця рамка відкриває нові терапевтичні мішені та критерії оцінки ефективності нейропротекторів при лЧМТ.

Важливо також підкреслити методологічну цінність нашого дослідження. Розроблений напівавтоматичний пайплайн для кількісного аналізу GLT-1-кластерів є першим інструментом, спеціально призначеним для оцінки просторового розподілу глутаматних транспортерів у конфокальних зображеннях. Публікація вихідного коду під відкритою ліцензією та депонування даних у відкритому репозиторії забезпечують відтворюваність наших результатів та дозволяють іншим лабораторіям адаптувати наш метод для своїх досліджень. Це є важливим внеском у культуру відтворюваності в нейробіологічних дослідженнях.

Наше дослідження також підкреслює важливість багатопараметричного підходу до аналізу молекулярних змін після лЧМТ. Використання кількох кількісних параметрів (площа кластерів, інтенсивність окремих кластерів, загальна інтенсивність, відносна площа, відносна інтенсивність) дозволяє отримати значно більш повну картину змін GLT-1, ніж вимірювання одного параметра. Цей підхід

може бути поширений на дослідження інших мембранних білків, розподіл яких змінюється при нейрологічних захворюваннях.

Багатопараметричний підхід, реалізований у нашому дослідженні, має методологічне значення, що виходить за межі конкретної наукової проблеми. Традиційний підхід до вивчення GLT-1 базується переважно на визначенні загального рівня білка методами Western blot або загальної інтенсивності імуофлуоресценції. Наше дослідження демонструє, що ці сумарні показники не відображають важливих змін у просторовому розподілі транспортера, які можуть мати вирішальне значення для його функції.

Розроблений нами протокол аналізу зображень на основі Napari може бути адаптований для вивчення просторового розподілу інших мембранних транспортерів та рецепторів при різних неврологічних захворюваннях. Відкритий код та модульна архітектура плагіна дозволяють іншим дослідникам модифікувати алгоритм для своїх потреб, що сприяє стандартизації кількісного аналізу конфокальних зображень у нейробіологічних дослідженнях. Ширше впровадження кластерного аналізу мембранних білків може виявити раніше не помічені зміни при різних патологічних станах, включаючи нейродегенеративні захворювання, епілепсію та ішемію мозку.

4.12. Узагальнення та перспективи

Результати дисертаційного дослідження дозволяють сформулювати загальну концептуальну модель, що інтегрує всі ключові знахідки та їх зв'язок із патофізіологією лЧМТ.

Легка черепно-мозкова травма ініціює послідовний каскад молекулярних подій у зоні CA1 гіпокампу, що спочатку спрямований на захист нейронів, але за відсутності терапевтичного втручання може ставати патологічним: (1) механічна сила деформує клітинні мембрани → механопорація → іонний дисбаланс (K^+ вихід, Na^+/Ca^{2+} вхід); (2) масивне вивільнення глутамату нейронами →

підвищення позаклітинного глутамату; (3) тригери кластеризації (іонний дисбаланс, надлишок глутамату) → кластеризація GLT-1 в астроцитах і нейронах; (4) кластеризований GLT-1 менш ефективний → недостатній кліренс глутамату → збережена ексайтотоксичність → відстрочене нейрональне ушкодження; (5) паралельно: пошкодження ГЕБ → надходження неексайтаторних амінокислот → зворотний режим GLT-1 → додаткове виділення глутамату.

Цефтріаксон, введений у гострій фазі, перериває цей каскад на кількох рівнях: пригнічує кластеризацію GLT-1 → підтримує рівномірний розподіл транспортера → ефективніший кліренс глутамату → менша ексайтотоксичність → менше ушкодження нейронів → кращі поведінкові та когнітивні результати. Ефект є часово-обмеженим і зворотним після завершення курсу.

Основними напрямками майбутніх досліджень, що безпосередньо впливають з результатів цієї роботи, є: (1) надроздільна мікроскопія для верифікації молекулярної природи кластеризації; (2) функціональні вимірювання GLT-1-активності *in situ*; (3) паралельні поведінкові та електрофізіологічні дослідження; (4) включення самок та інших часових точок; (5) дослідження GLT-1 в інших регіонах гіпокампу та неокортексі; (6) оптимізація протоколу цефтріаксону; (7) пошук нових фармакологічних агентів, що специфічно запобігають кластеризації GLT-1.

Крім зазначених пріоритетних напрямків, результати роботи відкривають можливості для кількох додаткових ліній дослідження. По-перше, вивчення ролі інших глутаматних транспортерів (GLAST/EAAT1, EAAC1/EAAT3) у контексті кластеризації після лЧМТ могло б визначити, чи є кластеризація специфічною для GLT-1, чи є загальною реакцією мембранних транспортерів на посттравматичний стрес. По-друге, дослідження ефекту повторних лЧМТ на кластеризацію GLT-1 має високу клінічну релевантність, оскільки повторні травми є поширеними у спорті та військових конфліктах і асоціюються з кумулятивними наслідками.

По-третє, вивчення зв'язку між кластеризацією GLT-1 та іншими аспектами посттравматичної нейропатології (тау-фосфорилуванням, бета-амілоїдним

відкладенням, мікрогліальною активацією) могло б інтегрувати наші знахідки в більш широку картину патогенезу хронічних наслідків лЧМТ. По-четверте, комбінація цефтріаксону з іншими нейропротективними стратегіями (антиоксидантами, протизапальними засобами, модуляторами нейрозапалення) заслуговує на дослідження як потенційно більш ефективний терапевтичний підхід порівняно з монотерапією.

Нарешті, розвиток технологій геномного редагування (CRISPR-Cas9) відкриває можливість створення трансгенних мишей із флуоресцентно міченим GLT-1, що дозволило б проводити живу візуалізацію кластеризації GLT-1 *in vivo* з використанням двофотонної мікроскопії через хронічне краніальне вікно. Такий підхід надав би безпрецедентну часову роздільну здатність для вивчення динаміки кластеризації від перших секунд після лЧМТ до повного відновлення.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше систематично досліджено просторовий розподіл глутаматного транспортера GLT-1 в астроцитах і пірамідних нейронах зони СА1 гіпокампу мишей після легкої черепно-мозкової травми та встановлено вплив цефтріаксону на цей розподіл. На підставі проведених досліджень сформульовано

такі висновки:

1. **У контрольних тварин GLT-1 рівномірно розподілений в астроцитах і сомах пірамідних нейронів зони СА1 гіпокампу.** Введення цефтріаксону (250 мг/кг, 5 діб) здоровим тваринам підвищувало загальну флуоресцентну інтенсивність GLT-1 в астроцитах на 19,1% (медіана 164 978 а.о. vs 138 464 а.о., $p < 0,01$), відносну інтенсивність у нейронах — на 22,8% ($p < 0,001$), відносну площу GLT-1 у нейронах — на 13,5% ($p < 0,001$), що свідчить про системну модулюючу дію цефтріаксону на GLT-1-систему, не обмежену посттравматичними умовами.
2. **Легка ЧМТ індукує кластеризацію GLT-1 в астроцитах СА1 зони гіпокампу.** На 3-й день після лЧМТ середня флуоресцентна інтенсивність окремих GLT-1-кластерів в астроцитах зростала вдвічі порівняно з контролем (медіана 691,5 а.о. vs 354,75 а.о., $p < 0,001$) за одночасного зниження загальної інтенсивності GLT-1 до 56,9% від контрольного рівня (медіана 78 877 а.о. vs 138 464 а.о., $p < 0,001$). Цей патерн — підвищення щільності окремих кластерів при зниженні загального рівня транспортера — спостерігається на 3-й, 7-й та 14-й дні після травми зі зменшенням вираженості у часі.
3. **Легка ЧМТ спричиняє кластеризацію GLT-1 у пірамідних нейронах зони СА1, що є новим феноменом нейрональної відповіді на травму.** На 3-й

день після лЧМТ відносна флуоресцентна інтенсивність GLT-1-кластерів у нейронах становила 21,3% від контрольного рівня (медіана 0,0848 vs 0,398, $p < 0,001$), що разом зі зменшенням відносної площі GLT-1-кластерів свідчить про концентрацію транспортера у меншій кількості дискретних ділянок. Виявлена нейрональна GLT-1 у соматичному відділі пірамідних нейронів є самостійним об'єктом посттравматичної регуляції та потенційною терапевтичною мішенню.

4. **Цефтріаксон (250 мг/кг, 5 діб, внутрішньоочеревинно) пригнічує посттравматичну кластеризацію GLT-1 як в астроцитах, так і в нейронах.** В астроцитах на 3-й день після лЧМТ середня інтенсивність GLT-1-кластерів у лікованих тварин перевищувала контрольне значення лише на 13,6% (медіана 403 а.о.) проти дворазового підвищення у нелікованих тварин (медіана 691,5 а.о., $p < 0,001$). У нейронах на 14-й день після лЧМТ відносна площа GLT-1-кластерів у лікованих тварин більш ніж удвічі перевищувала показник нелікованої групи (медіана 0,236 vs 0,112, $p < 0,001$), що свідчить про відтермінований ефект цефтріаксону, ініційований у гострій фазі травми.
5. **Запропоновано концептуальну модель, що пов'язує GLT-1-кластеризацію із посттравматичною ексайтотоксичністю та обґрунтовує механізм нейропротективної дії цефтріаксону.** Згідно з моделлю, масивне накопичення позаклітинного глутамату після лЧМТ спричиняє іон-залежну міграцію та субстрат-індуковану кластеризацію GLT-1 в астроцитах і нейронах. Кластеризований GLT-1 має знижену ефективність зворотного захоплення глутамату, підтримуючи ексайтотоксичний каскад. Цефтріаксон, впливаючи не лише на рівень синтезу GLT-1 (через NF- κ B/SP1), але й на просторовий розподіл транспортера, запобігає цьому механізму, що є новим виміром його нейропротективної дії при лЧМТ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nordström, A. and Nordström, P. (2018) 'Traumatic brain injury and the risk of dementia diagnosis: A nationwide cohort study', *PLoS Med*, 15(1), e1002496. doi: 10.1371/journal.pmed.1002496.
2. Lee, R.H.C. et al. (2018) 'Cerebral ischemia and neuroregeneration', *Neural Regen. Res.*, 13(3), pp. 373–385. doi: 10.4103/1673-5374.228711.
3. McKee, A.C. and Daneshvar, D.H. (2015) 'The neuropathology of traumatic brain injury', *Handb. Clin. Neurol.*, 127, pp. 45–66. doi: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00004-0.
4. Galgano, M. et al. (2017) 'Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors', *Cell Transplant*, 26(7), pp. 1118–1130. doi: 10.1177/0963689717714102.
5. Cook, G.A. and Hawley, J.S. (2014) 'A review of mild traumatic brain injury diagnostics: current perspectives, limitations, and emerging technology', *Mil. Med.*, 179(10), pp. 1083–1089. doi: 10.7205/MILMED-D-13-00435.
6. Saatman, K.E. et al. (2008) 'Classification of traumatic brain injury for targeted therapies', *J. Neurotrauma*, 25(7), pp. 719–738. doi: 10.1089/neu.2008.0586.
7. Nik, A. et al. (2018) 'The Efficacy of Glasgow Coma Scale (GCS) Score and APACHE II for Predicting Hospital Mortality of ICU Patients with Acute Traumatic Brain Injury', *Bull. Emerg. Trauma*, 6(2), pp. 141–145. doi: 10.29252/beat-060208.
8. Brenner, L.A. et al. (2023) 'Associations of Military-Related Traumatic Brain Injury With New-Onset Mental Health Conditions and Suicide Risk', *JAMA Netw. Open.*, 6, e2326296. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2023.26296.
9. Kong, L.-Z. et al. (2022) 'Military traumatic brain injury: a challenge straddling neurology and psychiatry', *Mil. Med. Res.*, 9, 2. doi: 10.1186/s40779-021-00363-y.
10. McKee, A.C. et al. (2013) 'The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy', *Brain*, 136(1), pp. 43–64. doi: 10.1093/brain/aws307.

11. Giza, C.C. and Hovda, D.A. (2001) 'The neurometabolic cascade of concussion', *J. Athl. Train.*, 36(3), pp. 228–235.
12. Furness, D.N. et al. (2008) 'A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes', *Neuroscience*, 157, pp. 80–94. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.08.043.
13. Raghavendra Rao, V.L. et al. (1998) 'Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain', *J. Neurochem.*, 70(5), pp. 2020–2027. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70052020.x.
14. Dorsett, C.R. et al. (2017) 'Traumatic Brain Injury Induces Alterations in Cortical Glutamate Uptake without a Reduction in Glutamate Transporter-1 Protein Expression', *J. Neurotrauma.*, 34(1), pp. 220–234. doi: 10.1089/neu.2015.4372.
15. Goodrich, G.S. et al. (2013) 'Ceftriaxone treatment after traumatic brain injury restores expression of the glutamate transporter, GLT-1, reduces regional gliosis, and reduces post-traumatic seizures in the rat', *J. Neurotrauma.*, 30(16), pp. 1434–1441. doi: 10.1089/neu.2012.2712.
16. Zabenko, Y.Y. and Pivneva, T.A. (2016) 'Flavonoid quercetin reduces gliosis after repetitive mild traumatic brain injury in mice', *Fiziol. Zh.*, 62, pp. 50–56. doi: 10.15407/fz62.05.050.
17. Naumenko, Y. et al. (2023) 'Mild traumatic brain injury as a pathological process', *Heliyon*, 9, e18342. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18342.
18. Arciniegas, D.B. et al. (2005) 'Mild traumatic brain injury: a neuropsychiatric approach to diagnosis, evaluation, and treatment', *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 1(4), pp. 311–327.
19. Carroll, L.J. et al. (2004) 'Methodological issues and research recommendations for mild traumatic brain injury', *J. Rehabil. Med.*, (43 Suppl): 113–125. doi: 10.1080/16501960410023877.
20. Dewan, M.C. et al. (2018) 'Estimating the global incidence of traumatic brain injury', *J. Neurosurg.*, 130(4), pp. 1080–1097. doi: 10.3171/2017.10.JNS17352.

21. Majdan, M. et al. (2016) 'Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis', *Lancet Public Health*, 1(2), pp. e76–e83. doi: 10.1016/S2468-2667(16)30017-2.
22. Taylor, C.A. et al. (2017) 'Traumatic Brain Injury–Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths — United States, 2007 and 2013', *MMWR Surveill. Summ.*, 66(9), pp. 1–16. doi: 10.15585/mmwr.ss6609a1.
23. Cassidy, J.D. et al. (2004) 'Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force', *J. Rehabil. Med.*, (43 Suppl): 28–60. doi: 10.1080/16501960410023732.
24. Gardner, R.C. and Yaffe, K. (2015) 'Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease', *Mol. Cell. Neurosci.*, 66(Pt B), pp. 75–80. doi: 10.1016/j.mcn.2015.03.001.
25. McKinlay, A. et al. (2008) 'Prevalence of traumatic brain injury among children, adolescents and young adults: prospective evidence from a birth cohort', *Brain Inj*, 22(2), pp. 175–181. doi: 10.1080/02699050801888824.
26. Sahler, C.S. and Greenwald, B.D. (2012) 'Traumatic Brain Injury in Sports: A Review', *Rehabil. Res. Pract.*, 2012, pp. 1–10. doi: 10.1155/2012/659652.
27. Ling, G. et al. (2009) 'Explosive blast neurotrauma', *J. Neurotrauma.*, 26(6), pp. 815–825. doi: 10.1089/neu.2007.0484.
28. Marshall, L.F. et al. (1992) 'The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography', *J. Neurotrauma.*, 9 Suppl 1: S287–S292.
29. Maas, A.I.R. et al. (2005) 'Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics', *Neurosurgery*, 57(6), pp. 1173–1182. doi: 10.1227/01.NEU.0000186013.63046.6b.
30. Wijdicks, E.F.M. et al. (2005) 'Validation of a new coma scale: The FOUR score', *Ann. Neurol.*, 58(4), pp. 585–593. doi: 10.1002/ana.20611.
31. Gennarelli, T.A. et al. (1982) 'Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate', *Ann. Neurol.*, 12(6), pp. 564–574. doi: 10.1002/ana.410120611.

32. Kleiven, S. (2013) 'Why most traumatic brain injuries are not caused by linear acceleration but skull fractures are', *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 1, 15. doi: 10.3389/fbioe.2013.00015.
33. Cernak, I. and Noble-Haeusslein, L.J. (2010) 'Traumatic brain injury: an overview of pathobiology with emphasis on military populations', *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 30(2), pp. 255–266. doi: 10.1038/jcbfm.2009.203.
34. Ommaya, A.K. and Gennarelli, T.A. (1974) 'Cerebral concussion and traumatic unconsciousness', *Brain*, 97(4), pp. 633–654. doi: 10.1093/brain/97.1.633.
35. Katayama, Y. et al. (1990) 'Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury', *J. Neurosurg.*, 73(6), pp. 889–900. doi: 10.3171/jns.1990.73.6.0889.
36. Chamoun, R. et al. (2010) 'Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury', *J. Neurosurg.*, 113(3), pp. 564–570. doi: 10.3171/2009.12.JNS09689.
37. Fesharaki-Zadeh, A. (2022) 'Oxidative Stress in Traumatic Brain Injury', *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 13000. doi: 10.3390/ijms232113000.
38. Beckhauser, T.F., Francis-Oliveira, J. and De Pasquale, R. (2016) 'Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity', *J. Exp. Neurosci.*, 10s1: JEN.S39887. doi: 10.4137/JEN.S39887.
39. Zhou, Y. and Danbolt, N.C. (2014) 'Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain', *J. Neural Transm.*, 121, pp. 799–817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8.
40. Cornelius, C. et al. (2013) 'Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection', *Antioxid. Redox Signal.*, 19(8), pp. 836–853. doi: 10.1089/ars.2012.4981.
41. Kim, S. et al. (2017) 'Neurometabolic Indicators of Mitochondrial Dysfunction in Repetitive Mild Traumatic Brain Injury', *Concussion*, 2(3), CNC45. doi: 10.2217/cnc-2017-0013.

42. Yoshino, A. et al. (1991) 'Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral concussion in rats', *Brain Res*, 561(1), pp. 106–119. doi: 10.1016/0006-8993(91)90755-k.
43. Longhi, L. et al. (2005) 'Temporal window of vulnerability to repetitive experimental concussive brain injury', *Neurosurgery*, 56(2), pp. 364–374. doi: 10.1227/01.neu.0000149008.73513.44.
44. Povlishock, J.T. and Katz, D.I. (2005) 'Update of neuropathology and neurological recovery after traumatic brain injury', *J. Head Trauma Rehabil.*, 20(1), pp. 76–94. doi: 10.1097/00001199-200501000-00008.
45. Vieira, R.C.A. et al. (2016) 'Diffuse Axonal Injury: Epidemiology, Outcome and Associated Risk Factors', *Front. Neurol.*, 7, pp. 1–12. doi: 10.3389/fneur.2016.00178.
46. Krieg, J.L. et al. (2023) 'Identifying the Phenotypes of Diffuse Axonal Injury Following Traumatic Brain Injury', *Brain Sci*, 13, 1607. doi: 10.3390/brainsci13111607.
47. Su, E. and Bell, M. (2016) 'Diffuse axonal injury', in Laskowitz, D. and Grant, G. (eds.) *Translational research in traumatic brain injury*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor and Francis Group.
48. Browne, K.D. et al. (2011) 'Mild Traumatic Brain Injury and Diffuse Axonal Injury in Swine', *J. Neurotrauma.*, 28(9), pp. 1747–1755. doi: 10.1089/neu.2011.1913.
49. Farkas, O., Lifshitz, J. and Povlishock, J.T. (2006) 'Mechanoporation induced by diffuse traumatic brain injury', *J. Neurosci.*, 26(12), pp. 3130–3140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5119-05.2006.
50. Büki, A. and Povlishock, J.T. (2006) 'All roads lead to disconnection? — Traumatic axonal injury revisited', *Acta Neurochir. (Wien).*, 148(2), pp. 181–193. doi: 10.1007/s00701-005-0674-4.
51. Humble, S.S. et al. (2018) 'Prognosis of diffuse axonal injury with traumatic brain injury. J', *Trauma Acute Care Surg*, 85, pp. 155–159. doi: 10.1097/TA.0000000000001852.

52. Nedergaard, M., Ransom, B. and Goldman, S.A. (2003) 'New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain', *Trends Neurosci*, 26(10), pp. 523–530. doi: 10.1016/j.tins.2003.08.008.
53. Zamanian, J.L. et al. (2012) 'Genomic analysis of reactive astrogliosis', *J. Neurosci.*, 32(18), pp. 6391–6410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
54. Zetterberg, H., Smith, D.H. and Blennow, K. (2013) 'Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood', *Nat. Rev. Neurol.*, 9(4), pp. 201–210. doi: 10.1038/nrneurol.2013.9.
55. Silver, J. and Miller, J.H. (2004) 'Regeneration beyond the glial scar', *Nat. Rev. Neurosci.*, 5(2), pp. 146–156. doi: 10.1038/nrn1326.
56. Martín-López, E. et al. (2013) 'Clonal astrocytic response to cortical injury', *PLoS One*, 8(9), e74039. doi: 10.1371/journal.pone.0074039.
57. Werner, C. and Engelhard, K. (2007) 'Pathophysiology of traumatic brain injury', *Br. J. Anaesth.*, 99(1), pp. 4–9. doi: 10.1093/bja/aem131.
58. Liu, Y. et al. (2017) 'TNF- α Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury', *J. Neurosci.*, 37(4), pp. 871–881. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2016.
59. Floyd, C.L. and Lyeth, B.G. (2007) 'Astroglia: Important Mediators of Traumatic Brain Injury', *Prog. Brain Res.*, 161, pp. 61–79. doi: 10.1016/S0079-6123(06)61005-4.
60. Nayak, D., Roth, T.L. and McGavern, D.B. (2014) 'Microglia development and function', *Annu. Rev. Immunol.*, 32, pp. 367–402. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240.
61. Donat, C.K. et al. (2017) 'Microglial Activation in Traumatic Brain Injury', *Front. Aging Neurosci.*, 9, pp. 1–20. doi: 10.3389/fnagi.2017.00208.
62. Loane, D.J. and Kumar, A. (2016) 'Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated', *Exp. Neurol.*, 275(3), pp. 316–327. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.018.

63. Hernandez-Ontiveros, D.G. et al. (2013) 'Microglia Activation as a Biomarker for Traumatic Brain Injury', *Front. Neurol.*, 4, pp. 1–9. doi: 10.3389/fneur.2013.00030.
64. Faden, A.I. et al. (2016) 'Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury', *Br. J. Pharmacol.*, 173(4), pp. 681–691. doi: 10.1111/bph.13179.
65. Villapol, S., Loane, D.J. and Burns, M.P. (2017) 'Sexual dimorphism in the inflammatory response to traumatic brain injury', *Glia*, 65(9), pp. 1423–1438. doi: 10.1002/glia.23171.
66. Belanger, H.G. et al. (2007) 'Recent neuroimaging techniques in mild traumatic brain injury', *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 19(1), pp. 5–20. doi: 10.1176/jnp.2007.19.1.5.
67. Jagoda, A.S. et al. (2008) 'Clinical policy: neuroimaging and decisionmaking in adult mild traumatic brain injury in the acute setting', *Ann. Emerg. Med.*, 52(6), pp. 714–748. doi: 10.1016/j.annemergmed.2008.08.021.
68. McAllister, T.W. (2011) 'Neurobiological Consequences of Traumatic Brain Injury', *Dialogues Clin. Neurosci.*, 13(3), pp. 287–300. doi: 10.31887/dcns.2011.13.2/tmcallister.
69. Rojo, D.R. et al. (2011) 'Influence of stochastic gene expression on the cell survival rheostat after traumatic brain injury', *PLoS One*, 6(8), e23111. doi: 10.1371/journal.pone.0023111.
70. Gao, X. and Chen, J. (2011) 'Mild traumatic brain injury results in extensive neuronal degeneration in the cerebral cortex', *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 70(3), pp. 183–191. doi: 10.1097/NEN.0b013e31820c6878.
71. Hernandez, M.L. et al. (2019) 'Neuronal Membrane Disruption Occurs Late Following Diffuse Brain Trauma in Rats and Involves a Subpopulation of NeuN Negative Cortical Neurons', *Front. Neurol.*, 10, 1238. doi: 10.3389/fneur.2019.01238.
72. Albeni, B.C. et al. (2000) 'Cortical and hippocampal cellular plasticity after experimental traumatic brain injury', *Exp. Neurol.*, 162(2), pp. 385–389. doi: 10.1006/exnr.1999.7338.

73. Guerriero, R.M., Giza, C.C. and Rotenberg, A. (2015) 'Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury', *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 15(5), 27. doi: 10.1007/s11910-015-0545-1.
74. Patel, T.P. et al. (2014) 'Single-neuron NMDA receptor phenotype influences neuronal rewiring and reintegration following traumatic injury', *J. Neurosci.*, 34(12), pp. 4200–4213. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4172-13.2014.
75. Pankevich, D.E., Davis, M. and Altevogt, B.M. (2011) Glutamate-related biomarkers in drug development for disorders of the nervous system: workshop summary. Washington, DC: National Academies Press.
76. Johnson, E.A. et al. (2005) 'Cell-specific DNA fragmentation may be attenuated by a survivin-dependent mechanism after traumatic brain injury in rats', *Exp. Brain Res.*, 167(1), pp. 17–26. doi: 10.1007/s00221-005-2362-2.
77. Divito, C.B. and Underhill, S.M. (2014) 'Excitatory amino acid transporters: Roles in glutamatergic neurotransmission', *Neurochem. Int.*, 73, pp. 172–180. doi: 10.1016/j.neuint.2013.12.008.
78. Mitani, A. and Tanaka, K. (2003) 'Functional Changes of Glial Glutamate Transporter GLT-1 during Ischemia: An In Vivo Study in the Hippocampal CA1 of Normal Mice and Mutant Mice Lacking GLT-1', *J. Neurosci.*, 23, pp. 7176–7182. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-18-07176.2003.
79. Pines, G. et al. (1992) 'Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter', *Nature*, 360, pp. 464–467. doi: 10.1038/360464a0.
80. Rimmele, T.S. and Rosenberg, P.A. (2016) 'GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter', *Neurochem. Int.*, 98, pp. 19–28. doi: 10.1016/j.neuint.2016.04.010.
81. Gegelashvili, G., Danbolt, N.C. and Schousboe, A. (1997) 'Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia', *J. Neurochem.*, 69(6), pp. 2612–2615. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69062612.x.

82. de Vivo, L. et al. (2010) 'GLT-1 Promoter Activity in Astrocytes and Neurons of Mouse Hippocampus and Somatic Sensory Cortex', *Front. Neuroanat.*, 3, 31. doi: 10.3389/neuro.05.031.2009.
83. Mennerick, S. et al. (1998) 'Neuronal Expression of the Glutamate Transporter GLT-1 in Hippocampal Microcultures', *J. Neurosci.*, 18, pp. 4490–4499. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-12-04490.1998.
84. Northington, F.J. et al. (1999) 'GLT1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity only after midgestation in the ovine fetal brain', *J. Neurobiol.*, 39, pp. 515–526. doi: 10.1002/(SICI)1097-4695(19990615)39:4<515::AID-NEU5>3.0.CO;2-U.
85. Schmitt, A. et al. (1996) 'Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: Non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry', *Neuroscience*, 71, pp. 989–1004. doi: 10.1016/0306-4522(95)00477-7.
86. Nakagawa, T. et al. (2008) 'Mechanisms of substrate transport-induced clustering of a glial glutamate transporter GLT-1 in astroglial-neuronal cultures', *Eur. J. Neurosci.*, 28(9), pp. 1719–1730. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06494.x.
87. Hou, J., Klippel, K. and Bose, P. (2025) 'Glutamate Excitotoxicity: A Key Secondary Injury Mechanism of Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury', *Front. Biosci.-Landmark.*, 30, 38904. doi: 10.31083/FBL38904.
88. Klausen, M.K. et al. (2022) 'The role of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in addictive disorders', *Br. J. Pharmacol.*, 179, pp. 625–641. doi: 10.1111/bph.15677.
89. Peterson, A.R. and Binder, D.K. (2019) 'Post-translational Regulation of GLT-1 in Neurological Diseases and Its Potential as an Effective Therapeutic Target', *Front. Mol. Neurosci.*, 12, 164. doi: 10.3389/fnmol.2019.00164.
90. Jia, Y.-F. et al. (2020) 'Astrocytic Glutamate Transporter 1 (GLT1) Deficiency Reduces Anxiety- and Depression-Like Behaviors in Mice', *Front. Behav. Neurosci.*, 14, 57. doi: 10.3389/fnbeh.2020.00057.

91. Huang, W.-Y. et al. (2019) 'miR-124 upregulates astrocytic glutamate transporter-1 via the Akt and mTOR signaling pathway post ischemic stroke', *Brain Res. Bull.*, 149, pp. 231–239. doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.04.013.
92. Rothstein, J.D. et al. (2005) 'Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression', *Nature*, 433(7021), pp. 73–77. doi: 10.1038/nature03180.
93. Soni, N., Reddy, B.V.K. and Kumar, P. (2014) 'GLT-1 transporter: An effective pharmacological target for various neurological disorders', *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 127, pp. 70–81. doi: 10.1016/j.pbb.2014.10.001.
94. Gao, J. et al. (2020) 'GLT-1 Knockdown Inhibits Ceftriaxone-Mediated Improvements on Cognitive Deficits in APP/PS1 AD Mice', *Front. Aging Neurosci.*, 12, 580772. doi: 10.3389/fnagi.2020.580772.
95. Smaga, I. et al. (2020) 'Molecular changes evoked by the beta-lactam antibiotic ceftriaxone across rodent models of substance use disorder and neurological disease', *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 115, pp. 116–130. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.05.016.
96. Cui, C. et al. (2014) 'Neuroprotective effect of ceftriaxone in a rat model of traumatic brain injury', *Neurol. Sci.*, 35(5), pp. 695–700. doi: 10.1007/s10072-013-1585-4.
97. Hellmich, H.L. et al. (2005) 'Traumatic brain injury and hemorrhagic hypotension suppress neuroprotective gene expression in injured hippocampal neurons', *Anesthesiology*, 102(4), pp. 806–814. doi: 10.1097/00000542-200504000-00017.
98. Atkins, C.M. (2011) 'Decoding Hippocampal Signaling Deficits After Traumatic Brain Injury', *Transl. Stroke Res.*, 2, pp. 546–555. doi: 10.1007/s12975-011-0123-z.
99. Walker, K.R. and Tesco, G. (2013) 'Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury', *Front. Aging Neurosci.*, 5. doi: 10.3389/fnagi.2013.00029.
100. Kirov, I.I. et al. (2013) 'Diffuse axonal injury in mild traumatic brain injury: a 3D multivoxel proton MR spectroscopy study', *J. Neurol.*, 260(1), pp. 242–252. doi: 10.1007/s00415-012-6626-z.

101. Bigler, E.D. et al. (1997) 'Hippocampal volume in normal aging and traumatic brain injury', *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 18(1), pp. 11–23.
102. Heo, S. et al. (2012) 'Hippocampal glutamate transporter 1 (GLT-1) complex levels are paralleling memory training in the Multiple T-Maze in C57BL/6J mice', *Brain Struct. Funct.*, 217, pp. 363–378. doi: 10.1007/s00429-011-0362-5.
103. Henneberger, C. et al. (2020) 'LTP Induction Boosts Glutamate Spillover by Driving Withdrawal of Perisynaptic Astroglia', *Neuron*, 108(5), pp. 919–936. doi: 10.1016/j.neuron.2020.08.030.
104. Popovitz, J., Mysore, S.P. and Adwanikar, H. (2019) 'Long-Term Effects of Traumatic Brain Injury on Anxiety-Like Behaviors in Mice: Behavioral and Neural Correlates', *Front. Behav. Neurosci.*, 13, 6. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00006.
105. Stanford, S.C. (2007) 'The Open Field Test: reinventing the wheel', *J. Psychopharmacol.*, 21(2), pp. 134–135. doi: 10.1177/0269881107073199.
106. Shoji, H. (2016) 'Scaling law in free walking of mice in circular open fields of various diameters', *J. Biol. Phys.*, 42(2), pp. 259–270. doi: 10.1007/s10867-015-9406-z.
107. Meier, T.B. et al. (2015) 'Recovery of cerebral blood flow following sports-related concussion', *JAMA Neurol*, 72(5), pp. 530–538. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.4778.
108. Zhou, Y. et al. (2013) 'Mild traumatic brain injury: longitudinal regional brain volume changes', *Radiology*, 267(3), pp. 880–890. doi: 10.1148/radiol.13122542.
109. Ng, S.Y. and Lee, A.Y.W. (2019) 'Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets', *Front. Cell. Neurosci.*, 13, 528. doi: 10.3389/fncel.2019.00528.
110. Comper, P. et al. (2005) 'A systematic review of treatments for mild traumatic brain injury', *Brain Inj*, 19(11), pp. 863–880. doi: 10.1080/02699050400025042.
111. Hiskens, M.I. et al. (2023) 'Repetitive mild traumatic brain injury-induced neurodegeneration and inflammation is attenuated by acetyl-L-carnitine in a preclinical model', *Front. Pharmacol.*, 14, 1254382. doi: 10.3389/fphar.2023.1254382.

112. Campos-Pires, R. et al. (2019) 'Xenon improves long-term cognitive function, reduces neuronal loss and chronic neuroinflammation after traumatic brain injury in mice', *Br. J. Anaesth.*, 123(1), pp. 60–73. doi: 10.1016/j.bja.2019.02.032.
113. Czeiter, E. et al. (2020) 'Blood biomarkers on admission in acute traumatic brain injury', *EBioMedicine*, 56, 102785. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102785.
114. Tejeda-Bayron, F.A. et al. (2021) 'Activation of Glutamate Transporter-1 (GLT-1) Confers Sex-Dependent Neuroprotection in Brain Ischemia', *Brain Sci*, 11, 76. doi: 10.3390/brainsci11010076.
115. Chen, K. et al. (2020) 'A New Model of Repetitive Traumatic Brain Injury in Mice', *Front. Neurosci.*, 13, 1417. doi: 10.3389/fnins.2019.01417.
116. Marmarou, A. and Foda, M.A. (1994) 'Van den Brink W. et al. A new model of diffuse brain injury in rats', *J. Neurosurg.*, 80, pp. 291–300. doi: 10.3171/jns.1994.80.2.0291.
117. Yimer, E.M., Hishe, H.Z. and Tuem, K.B. (2019) 'Repurposing of the β -Lactam Antibiotic, Ceftriaxone for Neurological Disorders: A Review', *Front. Neurosci.*, 13, 236. doi: 10.3389/fnins.2019.00236.
118. Sofroniew, N. et al. (2026) napari: a multi-dimensional image viewer for Python. Zenodo. doi: 10.5281/zenodo.18374344.
119. Naumenko, Y. et al. (2026) 'Ceftriaxone has a similar effect on astrocytic and neuronal GLT-1 distribution after mild traumatic brain injury', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 822, 153895. doi: 10.1016/j.bbrc.2026.153895.
120. Nicholson, K.J., Gilliland, T.M. and Winkelstein, B.A. (2014) 'Upregulation of GLT-1 by treatment with ceftriaxone alleviates radicular pain by reducing spinal astrocyte activation and neuronal hyperexcitability', *J. Neurosci. Res.*, 92, pp. 116–129. doi: 10.1002/jnr.23295.
121. McNair, L.F. et al. (2019) 'Deletion of Neuronal GLT-1 in Mice Reveals Its Role in Synaptic Glutamate Homeostasis and Mitochondrial Function', *J. Neurosci.*, 39, pp. 4847–4863. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0894-18.2019.

122. Rimmele, T.S. et al. (2021) 'Neuronal Loss of the Glutamate Transporter GLT-1 Promotes Excitotoxic Injury in the Hippocampus', *Front. Cell. Neurosci.*, 15, 788262. doi: 10.3389/fncel.2021.788262.
123. Murphy-Royal, C. et al. (2015) 'Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission', *Nat. Neurosci.*, 18, pp. 219–226. doi: 10.1038/nn.3901.
124. Shlosberg, D. et al. (2010) 'Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury', *Nat. Rev. Neurol.*, 6(7), pp. 393–403. doi: 10.1038/nrneurol.2010.74.
125. Carretero, V.J. et al. (2025) 'Targeting harmful effects of non-excitatory amino acids as an alternative therapeutic strategy to reduce ischemic damage', *Neural Regen. Res.*, 20, pp. 2454–2463. doi: 10.4103/NRR.NRR-D-24-00536.
126. Grewer, C., Gameiro, A. and Rauen, T. (2014) 'SLC1 glutamate transporters', *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, 466, pp. 3–24. doi: 10.1007/s00424-013-1397-7.
127. Pregnolato, S. et al. (2019) 'Glutamate Transport and Preterm Brain Injury', *Front. Physiol.*, 10, 417. doi: 10.3389/fphys.2019.00417.
128. Cao, T. et al. (2012) 'Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat', *Neuroscience*, 225, pp. 65–75. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.058.
129. Chen, W. et al. (2004) 'The Glutamate Transporter GLT1a Is Expressed in Excitatory Axon Terminals of Mature Hippocampal Neurons', *J. Neurosci.*, 24, pp. 1136–1148. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1586-03.2004.
130. Saatman, K.E., Creed, J. and Raghupathi, R. (2010) 'Calpain as a therapeutic target in traumatic brain injury', *Neurotherapeutics*, 7(1), pp. 31–42. doi: 10.1016/j.nurt.2009.11.002.
131. Peterson, A.R. and Binder, D.K. (2019) 'Regulation of Synaptosomal GLT-1 and GLAST during Epileptogenesis', *Neuroscience*, 411, pp. 185–201. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.05.048.

132. Wang, Y. and Harvey, B. (2016) 'Reducing excitotoxicity with glutamate transporter-1 to treat stroke', *Brain Circ*, 2, 118. doi: 10.4103/2394-8108.192523.
133. Brett, B.L. et al. (2022) 'Traumatic Brain Injury and Risk of Neurodegenerative Disorder', *Biol. Psychiatry.*, 91, pp. 498–507. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.05.025.
134. Gardner, R.C. et al. (2018) 'Mild TBI and risk of Parkinson disease: A Chronic Effects of Neurotrauma Consortium Study', *Neurology*, 90. doi: 10.1212/WNL.0000000000005522.
135. Hagos, F.T. et al. (2019) 'Membrane transporters in traumatic brain injury: Pathological, pharmacotherapeutic, and developmental implications', *Exp. Neurol.*, 317, pp. 10–21. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.02.011.
136. Martin, N.A. et al. (1997) 'Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma', *J. Neurosurg.*, 87(1), pp. 9–19. doi: 10.3171/jns.1997.87.1.0009.