

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ТРАВМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

На правах рукописи

БАРАНЕНКО БОРИС АЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 616-089.843:591.88:591.3:591.481.1:577.11:616- 0010036.17-092.9

**ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОЙ ФЕТАЛЬНОЙ
НЕРВНОЙ ТКАНИ НА ОБМЕН НЕЙРОМЕДИАТОРОВ В МОЗГЕ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

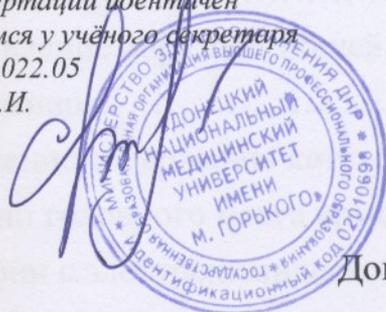
14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Сергей Евгеньевич Золотухин

Экземпляр диссертации идентичен
всем, находящимся у учёного секретаря
Диссовета Д 01.022.05
Стрельченко Ю.И.



Донецк – 2021

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ТРАВМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

На правах рукописи

БАРАНЕНКО БОРИС АЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 616-089.843:591.88:591.3:591.481.1:577.11:616- 0010036.17-092.9

**ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОЙ ФЕТАЛЬНОЙ
НЕРВНОЙ ТКАНИ НА ОБМЕН НЕЙРОМЕДИАТОРОВ В МОЗГЕ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Сергей Евгеньевич Золотухин

*Экземпляр диссертации идентичен
всем, находящимся у учёного секретаря
Диссовета Д 01.022.05
Стрельченко Ю.И.*

Донецк – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
РАЗДЕЛ I. Патогенетические механизмы повреждения нервной ткани и трансплантация фетальных клеток в лечении неврологических расстройств при травматической болезни головного мозга (обзор литературы).....	14
1.1. Особенности патогенеза черепно-мозговой травмы	14
1.2. Роль нейромедиаторов в патогенезе черепно-мозговой травмы ..	23
1.3. Обоснование изучения содержимого нейромедиаторов норадреналина, дофамина, серотонина и их метаболитов в структурах головного мозга крыс при нейротрансплантации ФНТ ...	26
1.4. Применение клеточных технологий для восстановления функции центральной нервной системы при нейрозаболеваниях и ЧМТ	33
РАЗДЕЛ II. Методы исследования.....	41
2.1. Экспериментальные животные.....	41
2.2. Модель тяжелой ЧМТ	41
2.3. Обоснование технологии трансплантации фрагментов ФНТ и модели трансплантации	43
2.4. Обоснование технологий трансплантации суспензии нервной ткани	45
2.5. Экспериментальная модель имплантации суспензии нервных клеток после тЧМТ	46
2.6. Экспериментальные группы	47
2.7. Обоснование изучения содержания нейромедиаторов норадреналина, дофамина, серотонина и их метаболитов в структурах головного мозга крыс при нейротрансплантации фетальной ткани	48
2.8. Приготовление образцов тканей мозга для определения биогенных аминов.....	51
2.9. Определение содержания катехоламинов и их производных в нервной ткани головного мозга крыс методом высокоэффективной хроматографии с электрохимической детекцией	51

2.10. Определение содержания серотонин в нервной ткани головного мозга крыс методом высокоэффективной хроматографии с электрохимической детекцией	52
2.11. Определение содержания гамма-аминомасляной кислоты в нервной ткани головного мозга крыс.....	54
2.12. Определение активности апоптоза в нервной ткани.....	55
2.13. Определение количества фосфолипидов в мозговой ткани.....	55
2.14. Статистические методы исследования.....	56
РАЗДЕЛ III. Роль апоптоза и нарушения обмена фосфолипидов в формировании неврологического дефицита в коре головного мозга при черепно-мозговой травме.....	57
РАЗДЕЛ IV. Патогенетическое значение расстройств нейросекреции катехоламинов, γ -аминомасляной кислоты и их метаболитов в коре и отдаленных структурах головного мозга при тяжелой черепно-мозговой травме	62
РАЗДЕЛ V. Влияние трансплантации фетальных стволовых клеток на выраженность апоптоза и состав фосфолипидов в коре головного мозга при черепно-мозговой травме	73
РАЗДЕЛ VI. Влияние трансплантации фетальной нервной ткани на обмен катехоламинов в травмированном полушарии и отдаленных структурах головного мозга при тяжелой черепно-мозговой травме ..	78
Раздел VII. Влияние трансплантации фетальных нервных клеток на нейросекрецию катехоламинов, γ -аминомасляной кислоты и их метаболитов в коре и отдаленных структурах головного мозга.....	87
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	95
ВЫВОДЫ.....	103
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЧМТ - черепно-мозговая травма

тЧМТ- тяжелая черепно-мозговая травма

ФНТ – фетальная (эмбриональная) нервная ткань

тФНТ – трансплантация фетальной нервной ткани

НА-норадреналин

ДА- дофамин

ГАМК – γ -аминомасляная кислота

5-ГОИУК - 5-гидроксииндолуксусная кислота

ГБК - гомованилиновая кислота

АТФ- аденозинтрифосфорная кислота

GDNGF - глиальный фактор роста нервов

FGF - фактор роста фибробластов

NGF - фактор роста нервов

BDNGF - мозговой фактор роста нервов

NT - 3 - нейротрофин- 3

NT - 4 - нейротрофин- 4

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) - одна из наиболее распространенных причин инвалидизации и смертности населения молодого и среднего возраста [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. ЧМТ вызывает первичные локальные и вторичные генерализованные органические изменения в нервной ткани, которые становятся фактором риска развития разнообразных отдаленных посттравматических осложнений в ЦНС и в организме в целом [8, 18, 19, 20, 21, 31, 32, 35, 36]. Доказано, что их причиной является тканевый дефицит, который возникает в результате непосредственного разрушения нервной ткани в месте удара, и вторичный тканевый дефицит, который развивается в результате нарушения метаболических процессов и после ЧМТ. Наиболее значимыми расстройствами при этом дефиците являются нарушения энергетического метаболизма [9, 10, 34, 37], интенсификация перекисления липидов и протеолиза [22, 33, 34, 40, 41, 42]. Расстройства метаболизма инициируют апоптоз и некроз [11, 12, 13] и протекают они как в нейронах, так и в глиальных клетках [14, 15, 16, 17]. Прогнозировать объем и локализацию вторичных повреждений невозможно, но наиболее чувствительны к разрушению дофаминергические нейроны среднего мозга и серотонинергические связи ядер шва [28, 31]. Из-за таких нейронных повреждений в отдаленном периоде после травмы часто развиваются вторичные патологические процессы и заболевания: психические, иммунные, эндокринные нарушения, эпилепсия, болезнь Паркинсона и другие [23, 24, 25, 26, 27, 29, 30].

Именно на предупреждении вторичных последствий ЧМТ сегодня врачи обращают внимание. В арсенале лечебных мероприятий у них - оксигенация, гипотермия, антиоксидантная и седативная терапия. Однако эти мероприятия полного восстановления ЦНС обеспечить не могут [38, 39, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49]. Поэтому не прекращается поиск передовых технологий лечения ЧМТ, которые могли бы предотвратить развитие вторичных отдаленных последствий этой травмы.

Степень разработанности темы

Неврологический дефицит при тяжелой ЧМТ (тЧМТ) формируется в результате гибели клеток после воздействия травмирующего фактора, а также в связи с активацией воспаления, ишемии и апоптоза клеток [39, 89]. Этот дефицит обуславливает значительные посттравматические изменения в организме, поскольку ведет к выпадению интеграционных взаимодействий и формированию разнообразных отдаленных последствий травмы [66]. Ему способствует нарушение обмена фосфолипидов, входящих в структуру клеточных мембран и вторичных мессенджеров [31]. Особенно чувствительны ко всем видам повреждения нейроны интегрирующих – дофаминергической, норадреналинергической и серотонинергической систем мозга [99, 152]. Выборочная стимуляция экспрессии генов нейротрофических факторов и активация репарационных процессов, таких как нейрогенез и синаптогенез, способствуют восстановлению функций ЦНС после ЧМТ [72, 88, 96]. В настоящее время патогенетическая значимость апоптоза нейронов и нарушения фосфолипидного обмена в формировании неврологического дефицита при тяжелой черепно-мозговой травме изучена недостаточно.

В основе многих неврологических расстройств сознания при ЧМТ лежит разобщение полушарий большого мозга, ствола и подкорковых структур [22, 40, 60]. В ряде работ доказано наличие выраженной дисфункции различных нейромедиаторных систем мозга при ЧМТ [36, 40, 45]. Важное значение приобретает изучение выраженности и направленности нейротрансмиттерной дисфункции мозга для характеристики неврологических и психических функций, а также оценки эффективности медицинской помощи в динамике ЧМТ. Для оценки тяжести нейротрансмиттерной дисфункции важно знать содержание в коре левого (травмированного) и правого полушария, в гиппокампе, стриатуме, среднем мозге, гипоталамусе и продолговатом мозге количества дофамина (ДА), его метаболита гомованилиновой кислоты (ГВК), норадреналина (НА), серотонина (Сер), его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК), гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК).

Перспективным методом для предупреждения вторичных последствий ЧМТ является трансплантация фетальной нервной ткани. Этот метод открывает возможность снижения тканевого и клеточного дефицита [67]. Доказано, что трансплантированная фетальная ткань тесно взаимодействует с нервной тканью реципиента [64, 65]. Проведенные исследования с использованием 6-гидроксидофаминовой модели болезни Паркинсона свидетельствуют, что в результате трансплантации фетальной нервной ткани может быть достигнуто полное восстановление двигательных поведенческих реакций [62, 63]. Одной из причин этого позитивного результата трансплантации является уменьшение дефицита дофаминергических и ГАМК-эргических клеток в стриатуме [53, 54, 56]. Воздействие фетальной ткани на нервную ткань реципиента происходит также через нейротрофические факторы, которые формируют сетку из отростков нервных клеток реципиента, идущих к трансплантированным клеткам [66].

Клиническое применение трансплантации фетальной нервной ткани при лечении некоторых нейродегенеративных заболеваний дают основание надеяться на эффективность этого метода и при лечении ЧМТ для замещения тканевого дефицита и профилактики нарушений интеграционных связей [68, 69].

В патогенетическом плане вопросы влияния фетальной нервной и мышечной ткани на нейромедиаторный обмен в головном мозге изучены недостаточно, как и сроки оптимальной трансплантации стволовых клеток. Содержание нейромедиаторов дофамина и норадреналина в диэнцефально-стволовом отделе и коре головного мозга после трансплантации фетальной нервной и мышечной ткани в раннем и позднем периоде тяжелой черепно-мозговой травмы имеет важное практическое значение и требует тщательного изучения.

Таким образом, влияние трансплантации аллогенной фетальной нервной ткани на обмен нейромедиаторов в мозге при экспериментальной тяжелой черепно-мозговой травме представляет важную научную и социальную задачу и служит побудительным мотивом для выполнения данной работы.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа выполнена в соответствии с планом НИР Республиканского травматологического центра (РТЦ) МЗ ДНР, клиники восстановительной нейрохирургии и отдела нейробиохимии Института нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины. Соискатель являлся соисполнителем темы НИР РТЦ МЗ ДНР «Специализированная медицинская помощь пострадавшим с травматическими повреждениями позвоночника и спинного мозга в условиях локального военного конфликта»

Цель исследования: установить патогенетическое значение расстройств нейросекреции катехоламинов, гамма-аминомасляной кислоты и их метаболитов в коре поврежденного полушария и отдаленных структурах головного мозга после тяжелой черепно-мозговой травмы и оценить эффективность их коррекции с помощью трансплантата сенсомоторной коры 18 - дневных эмбрионов крыс в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Изучить выраженность апоптоза нейронов и структуру фосфолипидов коры поврежденного мозга, содержание нейромедиаторов дофамина, норадреналина, серотонина, гама-аминомасляной кислоты и их производных 5-гидроксииндолуксусной кислоты и гомованилиновой кислоты в функциональных структурах головного мозга (коре правого и левого полушарий, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме, продолговатом и среднем мозге и в диэнцефально-ствольном отделе) и установить их патогенетическое значение при тЧМТ;

2. Изучить особенности влияния ФНТ, вводимой через 2 часа после тЧМТ, на выраженность апоптоза нейронов и структуру фосфолипидов коры поврежденного мозга, а также обмен нейромедиаторов в функциональных структурах головного мозга;

3. Изучить особенности влияния трансплантации диссоциированной ФНТ, вводимой через 2 часа после тЧМТ, на обмен нейромедиаторов в головном мозге.

4. Изучить влияние мышечной фетальной ткани, вводимой через 2 часа

после тЧМТ, на обмен нейромедиаторов в головном мозге;

5. Исследовать влияние трансплантата и суспензии фетальной нервной, фетальной мышечной ткани, вводимых через 5 суток после тЧМТ, на обмен нейромедиаторов в головном мозге.

Объект исследования: апоптоз нейронов и структура фосфолипидов коры поврежденного мозга, метаболизм нейромедиаторов в головном мозге крыс при тяжелой ЧМТ и его коррекция с помощью трансплантации фетальной нервной и мышечной ткани 18-дневных плодов крыс.

Предмет исследования: экспрессия проапоптического гена Вах, содержание фосфолипидов, показатели метаболизма катехоламинов - дофамина, норадреналина и гомованилиновой кислоты; индоламинов - серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты и гама-аминомасляной кислоты в структурах головного мозга крыс (коре правого и левого полушарий, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме, продолговатом и среднем мозге и диэнцефально-стволовом отделе) после тЧМТ и влияние на него трансплантата фетальных тканей 18 - дневных плодов крыс в эксперименте.

Методы исследования использованы для достижения поставленной цели и выполнения научных задач: моделирования тяжелой ЧМТ, трансплантация фетальных тканей; трансплантация суспензии нервных клеток; исследование экспрессии проапоптического гена Вах, содержания фосфолипидов, катехоламинов (норадреналина и дофамина) и продукта их метаболизма гомованиловой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ); исследование содержания серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты методом ВЭЖХ; исследование содержания гама-аминомасляной кислоты методом флуориметрии; определение белка; статистические методы обработки результатов.

Научная новизна полученных результатов. Усовершенствована методика и устройство для моделирования дозированной тЧМТ у крыс, предложен способ трансплантации фетальной нервной ткани в эксперименте.

Проведенные исследования освещают в патогенезе тЧМТ вопрос влияния на выраженность неврологического дефицита при тЧМТ апоптоза нейронов, нарушения состава фосфолипидов в коре (травмированного) левого полушария, а также метаболических изменений нейромедиаторов в разных отделах головного мозга животных и дают оценку эффективности трансплантации фетальной нервной и мышечной ткани. Проведенные исследования доказали, что в результате дегенеративных изменений в травмированном полушарии, стриатуме, гипоталамусе, среднем и продолговатом мозге снижается содержание нейромедиаторов дофамина, серотонина, ГАМК и норадреналина. Введение трансплантата в левое (травмированное) полушарие стимулирует восстановительные процессы в головном мозге, что приводит к повышению уровня нейромедиаторов в месте нанесения травмы и в отдаленных участках головного мозга экспериментальных животных. ФНТ сенсомоторной коры 18-дневных плодов крыс, введенная в раннем периоде тЧМТ, восстанавливает, в частности, количество дофамина, норадреналина и ГАМК и почти не влияет на содержание серотонина. Клетки этой ткани способны дифференцироваться и интегрироваться в нейронные сети реципиента, а также производить необходимые трофические факторы. В позднем периоде тЧМТ трансплантация ФНТ уровень катехоламинов в поврежденном полушарии мозга не восстанавливает, а в отдаленных отделах мозга вызывает дисбаланс. Фетальная мышечная ткань во всех периодах тЧМТ неэффективна. В виду высокой пластичности ФНТ является идеальным источником клеток для трансплантации.

Теоретическое и практическое значение полученных результатов

В работе установлено значение расстройств нейросекреции катехоламинов, гамма-аминомасляной кислоты и их метаболитов в коре поврежденного полушария и отдаленных структурах головного мозга после тяжелой черепно-мозговой травмы и дана оценка эффективности их коррекции с помощью трансплантата сенсомоторной коры 18-дневных эмбрионов крыс в эксперименте.

Полученные результаты относительно восстановления содержания нейромедиаторов в функциональных отделах головного мозга при трансплантации ткани сенсомоторной коры после тЧМТ являются основанием для апробации метода нейротрансплантации при тяжелой ЧМТ в клинической практике.

Сведения о восстановлении содержания катехоламинов и веса левого (травмированного) полушария, а также восстановления норадреналина и дофамина в диэнцефально-ствольном отделе, стриатуме, гипоталамусе, гиппокампе, среднем и продолговатом мозге создают теоретическую базу для прогнозирования ожидаемых результатов от трансплантации ФНТ и показаний для использования такого метода лечения в клинике.

Положения, выносимые на защиту:

1. Тяжелая ЧМТ сопровождается увеличением числа апоптических нейронов в коре травмированного головного мозга, изменением состава фосфолипидов и глубокими нарушениями обмена нейромедиаторов дофамина, норадреналина, серотонина, гама-аминомасляной кислоты и их производных 5-гидроксииндолуксусной кислоты и гомованилиновой кислоты в функциональных структурах головного мозга (коре правого и левого полушарий, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме, продолговатом и среднем мозге и в диэнцефально-ствольном отделе);

2. Нарушения нейромедиаторного обмена в головном мозге после тЧМТ коррелируют с нейродегенерацией нейронов и расстройствами функции головного мозга;

3. В раннем периоде тЧМТ ФНТ способна восстанавливать обмен нейромедиаторов во всех структурах головного мозга, а в позднем периоде она неэффективна.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов, изложенных в диссертационной работе, обусловлена достаточным объемом репрезентативного экспериментального материала, использования современных средств и методов исследования, адекватных целям и задачам

работы, выбором современных методов статистического анализа полученных данных.

Положения, изложенные в диссертации, базируются на полученных данных и соответствуют материалу, представленному в публикациях.

Материалы диссертационной работы внедрены в практику консультативной поликлиники РТЦ МЗ ДНР, нейрохирургического отделения Донецкого областного клинического территориального медицинского объединения, в хирургических клиниках Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины и Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького, а также в педагогический процесс кафедры патологической физиологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького.

Личный вклад соискателя. Диссертация является самостоятельным научным исследованием автора. Диссертантом персонально проанализирована научная литература по исследуемой проблеме и проведен патентный поиск. В соответствии с поставленной руководителем диссертации целью работы для ее достижения соискателем сформулированы задачи и составлен план исследований. Диссертант самостоятельно моделировал тЧМТ у крыс, выделял для исследования нейромедиаторов необходимые структуры головного мозга, получал эмбриональную нервную и мышечную ткани, вводил трансплантат в поврежденные зоны моза. Автор самостоятельно выполнил статистическую обработку и внедрение результатов в практику. Им также самостоятельно написаны главы диссертации и автореферат. Диссертантом в работе не были использованы результаты и идеи соавторов публикаций.

Апробация результатов диссертации. Диссертационная работа апробирована на заседании общества травматологов-ортопедов МЗ ДНР, на совместном заседании кафедры патологической физиологии Донецкого национального медицинского университета и отдела координации научных исследований и прогнозирования РТЦ МЗ ДНР. Основные положения диссертации были представлены на 15 конгрессе СФУЛТ В (2014 г.); XI -

Українському біохімічному конгресі (2014 г.); на міжнародній науково-практичній конференції в г. Львові (2014 г.).

Публікації. По матеріалах дисертації опубліковано 14 наукових робіт, в тому числі вісім статей в рецензованих журналах, рекомендованих ВАК (дві з них – без співавторів), чотири статті в інших журналах (одна з них – без співавторів) і дві роботи в матеріалах з'їздів і конференцій.

Структура і об'єм дисертації. Дисертаційна робота викладена на 121 сторінці машинописного тексту, складається з вступлення, огляду літератури, глави матеріалів і методів досліджень, п'яти глав описання експериментальних досліджень, узагальнення і аналізу отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел літератури, який містить 159 назв (45 кирилицею і 112 латиницею). Дисертація ілюстрована 32 малюнками і 6 таблицями.

РАЗДЕЛ I
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ
ТКАНИ И ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ФЕТАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ
НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ
БОЛЕЗНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Особенности патогенеза черепно-мозговой травмы

Травма мозга, особенно тяжелая черепно-мозговая травма (тЧМТ), является основной причиной смертности людей в возрасте до 45 лет [85, 121, 150]. По данным статистики, тЧМТ и ее последствия представляют серьезную экономическую проблему в развитых странах [110]. За последнее десятилетие догоспитальное и госпитальное лечение пациентов с тЧМТ значительно улучшилось [48, 49]. Между тем, профилактика и лечение последствий ЧМТ еще далеки до окончательного решения [120]. Поэтому современный подход к проблеме ставит перед медициной задание не только спасения жизни, но и сохранения дееспособности и здоровья больным. Эпидемиологические исследования показали, что значительное количество пациентов после тЧМТ имеет постоянный комплекс жалоб, которые могут существовать в течение месяцев и даже лет [59, 119, 124, 126, 130, 133, 144, 153]. Эти симптомы вошли в состав посттравматического синдрома. Доказано, что дети после тЧМТ хуже учатся и плохо разговаривают, а через 2 года после тЧМТ 79% из них попадают в группы, которые требуют специальной учебы [95, 151]. В 63% случаев тЧМТ приводит к изменениям в поведении и нейропсихологическим расстройствам [146, 155].

Исследования патофизиологов, занимавшихся посттравматическим синдромом, позволили четко очертить характер и локализацию наиболее опасных функциональных и метаболических нарушений поврежденного мозга. [61, 125, 131, 141, 154, 157]. Различают интракраниальные и системные

механизмы нарушений нервной ткани [69, 70]. Выделяют также первичные и вторичные расстройства [111].

Сегодня накоплено значительное количество доказательств относительно органической основы формирования посттравматического синдрома. Есть также много достижений в понимании причин повреждений нервных клеток и способов их предупреждения. На основе исследования вызванных потенциалов доказано, что у 13% пациентов с посттравматическим синдромом симптомы формируются в результате дисфункции ствола мозга [84].

Принято травматические повреждения мозга классифицировать на два вида - на локальную и диффузную травму. Эти виды травмы сложно различить. Считается, что именно в месте первичного повреждения происходит инициация процессов поглощения поврежденными клетками ионов [100, 116, 123], что в свою очередь активирует экспрессию ранних генов. В этом месте также очень быстро активируется накопление свободных радикалов кислорода и перекисления липидов [86, 87, 100, 105, 118], происходит активация фосфолипаз с дальнейшим распадом клеточных мембран и блокированием транспорта аксоплазмы [54, 145, 148]. Развитие патологических процессов в месте травмирования приводит к локальному повреждению ткани мозга. Локальные первичные повреждения углубляются и охватывают все большие участки прилегающей нервной ткани. Органические изменения, которые наблюдаются в месте повреждения мозга, коррелируют с ухудшением и тяжестью состояния пострадавших. Эти изменения проявляются некрозом субкортикального белого вещества с повреждением соматосенсорной зоны, а в последующем – развитием сенсорного дефицита и нарушением пространственной ориентации [142].

Обработка результатов МРТ указывает, что тЧМТ имеет диффузное проявление, которое отображается в увеличении по весу соотношения желудочки/мозг и объема височного рога. Изменения указанных показателей коррелируют с тяжестью травмы [117]. Диффузные повреждения мозга зависят от вторичных ишемических процессов в нервной ткани. Доказано, что

инициация апоптоза является причиной диффузной потери нервных клеток и дегенерации отростков головного мозга после ЧМТ [114].

К основным причинам развития вторичных повреждений нервной ткани при ЧМТ относят отек мозга, который может повлечь ишемию, а также процессы воспаления [73]. Отек мозга является следствием оксидативного стресса и нарушения циркуляции крови. Отек нервной ткани также имеет диффузный характер и охватывает весь мозг. Первично отек мозга связан с церебральным вазоспазмом и, как сейчас считается, оксидативным стрессом. Основной чертой оксидативного стресса является накопление перекисных продуктов органического и неорганического происхождения, токсическое влияние которых на макромолекулы клеток дает начало некротическим изменениям в мозге. Считается, что эндотелин-1 - полипептид из 21 аминокислоты, непосредственно связан с этими процессами. Введение антагониста рецептора эндотелина 1 - RO 61-1790 за 24 часа до травмы снижает количество погибших нейронов в мозжечке после ЧМТ. Через 1, 3 и 7 дней после травмы авторы также отмечали в крови повышение концентрации шокового белка HSP70 - маркера нейронального стресса [136].

Первичные травматические повреждения являются очагами инициации процессов воспаления, которое может продолжаться в течение больше трех недель, что в свою очередь делает центральную нервную систему чувствительной к гипотензии, гипоксии и пирексии.

По современной классификации, в течении ЧМТ выделяют 3 периода травмы: острый, промежуточный и период последствий [136]. Острый период характеризуется травматическим воздействием, непосредственным повреждением вещества головного мозга и длится от 2 до 10 недель в зависимости от степени тяжести ЧМТ. В течение острого периода происходят первичные реакции тканей на повреждающее воздействие, играют роль воспалительные, гемодинамические и гемореологические нарушения, обуславливающие опосредованное повреждение головного мозга. Промежуточный период характеризуется стабилизацией клинического состояния

пациента и активизацией регенерационно-репаративных процессов. В промежуточном периоде происходит частичное восстановление неврологического дефицита (двигательных, чувствительных, координационных функций) и по окончании устанавливается динамическое равновесие между адаптационно-приспособительными механизмами и патофизиологическими процессами. Длительность промежуточного периода составляет от 2 до 6 месяцев в зависимости от степени тяжести травмы, при легкой ЧМТ он не превышает 2 месяцев. Третий период черепно-мозговой травмы – период последствий. С точки зрения патофизиологии, в этом периоде клинически состояние пациента и динамика неврологического дефицита определяется балансом противоположно направленных процессов: дегенеративно-деструктивных и регенеративно-репаративных. Преобладание одного из этих процессов определяет течение и прогноз заболевания [136].

Выделяют несколько клинических вариантов течения ЧМТ: возможен регресс неврологической симптоматики вплоть до выздоровления, стабилизация неврологического дефицита на определенном уровне и наиболее неблагоприятный вариант – прогрессивное течение травматической болезни головного мозга [1, 9]. При прогрессивном течении в периоде последствий происходит нарастание неврологической симптоматики и развитие новых неврологических синдромов. Этот процесс связывается с различными механизмами, такими как аутоиммунное воздействие на ткань головного мозга вследствие аутосенситизации, нарушениями внутримозговой и системной гемодинамики, ликвородинамическими нарушениями и запуском нейродегенеративного процесса [1, 7].

Анализ литературы позволяет сделать вывод, что основными цепями патогенетических процессов после ЧМТ, которые определяют долгосрочные и необратимые изменения в нервной ткани, есть гипоксия и выбросы возбуждающих нейромедиаторов, которые вызывают нарушение нейродинамики, кардиодисфункцию и кишечную вазодилатацию.

Современные представления о причинах вторичных патогенетических

изменений при тЧМТ отводят важную роль метаболизму глюкозы. Считается, что тяжесть травмы непосредственно коррелирует с уровнем глюкозы в плазме крови [134], а быстрое его снижение до нормы предотвращает развитие вторичных повреждений мозга. ЧМТ и вторичная ишемия действуют синергично на нарушение энергетического метаболизма [102]. Так, например, как утверждают авторы исследования [102] уже через 1 час после травмирования уровень лактата в ликворе повышается в 3-5 раз, потом после билатеральной перевязки каротидной артерии (еще через час) уровень лактата повышается вторично, а уровень глюкозы в ликворе наоборот двухступенчато падает. Авторы работы [102] делают предположение, что такая динамика изменения лактата свидетельствует о нарушении процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях. При всех равных условиях повышенный уровень лактата коррелирует с негативным прогнозом выхода из критического состояния [92].

Исследование связи энергетического метаболизма мозга и вторичных повреждений ткани мозга, проведенное с использованием магнитно-резонансного анализа (МРА), показало, что при односторонней 90 минутной перевязке каротидной артерии у крыс наблюдаются фазные изменения в характере отека мозга и снижение соотношения крестинфосфата и неорганического фосфора. Через 1 час после реоксигенации отек спадает, охватывая только 4% мозга. Через 5 часов развивается вторичный цитотоксический и вторичный вазогенный отек мозга, который держится 24 часа, охватывая уже 45% мозговой ткани [57]. Соотношение же крестинфосфата и неорганического фосфата медленно растет в течение 13 часов, а потом опять снижается в пределах 24 часов. Авторы исследования считают, что вторичное снижение энергетического метаболизма в мозге отображает активацию глии с последующей гибелью глиальных клеток [57].

Интересное исследование динамики гибели нейронов при вторичном повреждении мозга было проведено с использованием модели механической травмы и гипоксии у крыс [115]. Полученные результаты указывают на корреляцию между количеством погибших нейронов и сроком гипоксии.

Показано также, что гипотермия существенно снижает количество погибших нейронов в мозге подопытных животных.

Несмотря на углубленное изучение причин вторичных повреждений в результате ишемии, механизм регуляции гибели нейронов до конца не изучен. Считают, что сериновые протеазы в иницировании апоптоза играют центральную роль [113]. Кроме того процессы деградации ДНК, вызванные оксидативным стрессом, иницируют ДНК-полимеразу, которая очень быстро создает дефицит НАД, клеточных макроэргов и тиолов. Таким образом, не исключено, что истощение внутриклеточных энергетических ресурсов является сигналом для инициации апоптоза. Считается, что нейропротекторные методики, которые имеют в своей основе ингибирование этих процессов, будут наиболее перспективными для защиты нейронов [159], поскольку они не влияют на передачу нервных импульсов.

Важную роль в развитии вторичных повреждений в мозге при ЧМТ имеют простагландины. Исследование содержания в плазме крови у пациентов через 3, 7 и 14 суток после тяжелой ЧМТ тромбоксана В₂, 6-кето - Pg F_{2α} и простагландина Е₂ показало существенное повышение концентрации всех этих биоактивных производных арахидоновой кислоты [8, 13]. При этом наблюдалась позитивная корреляция между состоянием больных и содержанием этих производных. Авторы исследования считают, что концентрация этих биоактивных производных арахидоновой кислоты может быть дополнительным критерием прогнозирования и тяжести состояния больных после ЧМТ [127, 147]. В патогенетическом плане важно, что выявилась связь не только между свободнорадикальным образованием производных арахидоновой кислоты, но и с фермент зависимым ее переокислением. В результате этих процессов изменяются свойства биомембран нервных клеток, а также тонус сосудов, который может способствовать закреплению нарушений кровообращения и развития вторичной гипоксии [78, 93].

Новейшие исследования с использованием экспериментальных моделей ЧМТ у животных позволили установить важную роль в повреждении нейронов

возбуждающих аминокислот [75]. В частности, показано, что при ЧМТ происходит выброс глутамата, который приводит к повреждению и гибели нервных клеток путем некроза и апоптоза. Установлено, что разрушительные процессы в нервной ткани опосредствованы активацией протеолитических реакций. Доказано, что именно выброс глутамата приводит к повышению количества цистеиновой протеазы и каспаза-3 позитивных клеток [94].

Исследование уровня глутамата показало, что высокое содержание этой аминокислоты (> 20 мкМоль/л) хорошо коррелирует с плохим прогнозом критического состояния. Авторы исследования [75] считают, что именно выбросы возбуждающих аминокислот вызывают локальные и диффузные повреждения нейронов. Аналогичные результаты получены при изучении концентрации не только глутамата, но также глицина и γ -аминомасляной кислоты в микродиализате цереброспинальной жидкости у экспериментальных животных [74]. Авторы исследования указывают на значительное повышение уровня этих метаболитов в цереброспинальной жидкости. Их выводы не противоречат механизму вхождения кальция в нервные клетки с последующим изменением метаболизма. Повышенный уровень внутриклеточного кальция наблюдался в коре, гиппокампе, хвостатом ядре и таламусе [63, 112]. Однако некоторые исследователи указывают, что уровень глутамата может и не определять степень разрушения клеток мозга [65], соглашаясь, что глутамат является одной из составных причин развития вторичных повреждений после ЧМТ.

Для предотвращения негативных процессов развития гипоксии, расстройства терморегуляции (brain thermo - pooling) и нейрогормональных нарушений, которые приводят к цитокиновой энцефалопатии и селективному повреждению дофаминергических нейронов в результате интенсификации свободнорадикальных процессов, используется гипотермия [50, 82]. Температуру мозга снижают до 34°C и поддерживают на таком уровне в течение одной недели. В результате использования такой методологии достигается устранение гипоксии, свободнорадикальных реакций и отека мозга. Считается, что с

помощью гипотермии в комбинации с фармакологическими препаратами может быть снижено вредное действие возбуждающих аминокислот и свободных радикалов [50, 82].

Существенным недостатком этого метода является необходимость поддержания низкого уровня глюкозы в плазме. При повышении концентрации глюкозы в крови она диффундирует в ЦНС, а в условиях сниженного энергетического метаболизма это приводит к накоплению лактата. Экспериментальные исследования показали, что гипергликемия приводит к еще большей потере нейронов в СА1 и СА3 районе гиппокампа, чем при гипоксии [46].

Таким образом, можно обобщить, что гипотермия после ЧМТ предупреждает гипоперфузию, снижает функциональный базальный метаболизм, снижает накопление лактата и предупреждает отек, ингибирует выброс возбуждающих нейротрансмиттеров, восстанавливает баланс Ca^{++} и Na^{+} , снижает переокисление и образование перекисных радикалов, стимулирует экспрессию регенеративных ранних генов. Однако следует отметить и существенные побочные эффекты гипотермии: возникает миокардиальная ишемия, кардиальная аритмия, снижение силы сокращения левого желудочка сердца, нарушение коагуляции и метаболизма [81, 149].

Для предотвращения активации протеолитических процессов активно исследуются блокаторы рецепторов возбуждающих аминокислот. Изучено влияние блокатора NMDA рецепторов МК- 801 на спонтанную двигательную активность у крыс после ЧМТ. Показано, что состояние животных после введения препарата улучшается. Однако гистологическое исследование не выявило улучшения морфологической картины изменений в гипоталамусе [55].

Если рассматривать вопрос о чувствительности отростков и тел нейронов к повреждениям, то в литературе есть свидетельство, что тела нейронов более стойкие к травмированию, чем их отростки [77]. В последующем вторичные повреждения мозга приводят к существенной демиелинизации нервных волокон. Об этом свидетельствует рост концентрации белка плазмы S -100В после ЧМТ

[139]. Гибель нейронов после тяжелой ЧМТ сопровождается активацией микроглии. Считается, что микроглия углубляет вторичное поражение нервной ткани мозга за счет выброса токсичных цитокинов [107].

Некоторые исследователи связывают метаболические изменения в полушариях и гиппокампе с изменениями в поведении подопытных животных. Считается, что повреждение правого полушария головного мозга, гиппокампа и амигдаллярного комплекса вызывает у них страх [71].

Важное значение для формирования посттравматического синдрома имеет nigростриарный комплекс. Чувствительность nigростриарных интегральных связей была доказана с использованием SPET анализа. Для этих исследований было отобрано 6 пациентов с легкой ЧМТ, 10 с ЧМТ средней степени тяжести и 4 с тяжелой ЧМТ. С помощью SPET анализа с использованием ^{123}I -йодбензамида (IBZM) исследовали D2 рецепторы. Выявляли корреляцию между количеством этих рецепторов и тяжестью травмы. Неврологический статус изучали с помощью нескольких неврологических тестов. Проведенные исследования показали, что у детей с ЧМТ количество стриарных D2 рецепторов снижается в зависимости от степени травмы. У детей без неврологического дефицита после травмы плотность дофаминовых рецепторов более высока, чем у тех, которые имели неврологические осложнения [68]. В исследовании [62] утверждается, что сразу после ЧМТ плотность D1 и D2 рецепторов в стриатуме по сравнению с контролем уменьшалась на 50%, а через 24 часа повышалась на 30%. С дефицитом дофаминергической передачи на уровне D1 и D2 рецепторов в посттравматическом периоде связывают дефицит памяти [144].

Таким образом, базируясь на данных литературы, можно сделать вывод, что существуют эффективные методики только для лечения больных в остром периоде тяжелой ЧМТ, но эффективных методик, которые бы предотвращали развитие посттравматического синдрома, нет. Медикаментозная терапия, включающая в себя нейропротекторы, антиоксиданты, гормоны и препараты, улучшающие мозговое кровообращение, имеет ограниченный успех. Видимо, фармакотерапия, направленная на восстановление аксонального повреждения

будет разработана не в этом столетии [52].

1.2. Роль нейромедиаторов в патогенезе черепно-мозговой травмы

Существует несколько низкомолекулярных нейромедиаторных систем головного мозга: норадренергическая, дофаминергическая, серотонинергическая и холинергическая. Эти системы играют важнейшую роль в поддержании уровня сознания и адаптивного поведения. Они участвуют в принятии решений организма в ответ на изменяющиеся внешние условия и поэтому получили название восходящих нейромодуляторных систем мозга. Для всех нейромедиаторных систем характерно: 1) подкорковая локализация; 2) наличие большого количества проекций к стволу, таламусу и коре; 3) наличие множественных реципрокных связей с корой лобных долей и лимбической системой.

Основные различия между нейромодуляторными системами заключаются в типе активирующего их внешнего стимула. Так, серотонинергическая система активируется в ответ на стресс или угрожающий стимул; холинергическая система - в ответ на усиление внимания; дофаминергическая система - при наличии положительного подкрепления (ожидании награды); для норадренергической системы значимыми стимулами оказываются новизна и отличительные признаки. Структуры мозга, в которых обнаруживается наибольшее содержание ГАМК, имеют и высокий уровень дофамина. Поэтому во многих предположениях об участии ГАМК в патогенезе ЧМТ этот нейротрансмиттер рассматривается в связи с изменением функции дофаминергических нейронов.

Основные источники катехоламинергических (норадренергической, дофаминергической и адренергической) систем мозга находятся в стволе и организованы в отдельные ядра. При исследовании мозга человека самые высокие концентрации НА были обнаружены в стволе (LC, паранигральные и парабрахияльные пигментные ядра и интерпедункулярное ядро). В

промежуточном мозге наибольшее содержание НА отмечено в супраоптическом ядре гипоталамуса. Высокая концентрация НА показана также в структурах лимбической системы (миндалине, обонятельной области, nucleus accumbens).

К ГАМК-ергической системе относятся интернейроны коры, афферентные волокна, идущие от полосатого тела к бледному шару и черной субстанции, а также клетки Пуркинью мозжечка. С ГАМК-ергической системой связано и тормозящее влияние глицина, локализация которого ограничена нейронами ствола мозга и спинного мозга. Быстрое развитие торможения нейрональной активности путем активации глициновых и ГАМК-ергических рецепторов опосредовано открытием ионных хлорных каналов, что позволяет ионам Cl⁻ проникать в нейрон, вызывая их гиперполяризацию. В результате этого они становятся менее чувствительными к стимулам. В настоящее время весьма актуально изучение роли ГАМК-ергических механизмов в повышении устойчивости организма к ЧМТ. Однако исследования подобного плана немногочисленны и противоречивы, что обуславливает необходимость дальнейшего изучения ГАМК-ергических процессов при тЧМТ.

Установлены фазные изменения уровней нейромедиаторов в течении травматической болезни мозга. На формирование адаптивных процессов при ЧМТ определенный отпечаток накладывают также выраженность вторичных повреждений, возраст, наличие сопутствующих заболеваний, осложнения и проводимое лечение.

При ушибах легкой степени определяется незначительное увеличение адреналин и норадреналин в течение 5-7 сут. При ушибах средней тяжести выраженность реакции активации симпато-адреналовой системы (САС) значительнее и длительность ее достигает 10-14 сут. При ушибах тяжелой степени активации САС с повышением выброса адреналина и норадреналина продолжается до 21 сут., однако с 10-14-х сут. наблюдается тенденция к снижению уровней дофамина (ДА) и ДОФА, что говорит о снижении запасов САС и ее истощении. Наиболее высокие показатели адреналина, норадреналина и ДА определяются при повреждении стволовых структур, однако к концу 1-х

сут. уровни их резко снижаются, что отражает степень повреждения центральных структур, ответственных за синтез и обмен нейромедиаторов. Быстрое истощение САС наблюдается при ушибах-размозжениях мозга, сочетанных с субдуральными гематомами, и диффузном аксональном повреждении.

Серотонин является одним из основных медиаторов стресслимитирующей системы. Он обладает широким спектром действия в организме человека, начиная с ранних этапов внутриутробного развития. Имеются данные об участии серотонинергической системы в регуляции иммуногенеза. Коммуникация между иммунной и нервной системами происходит в двух направлениях [13]. Цитокины обеспечивают взаимодействие нейроэндокринной и иммунной систем. Если в настоящее время следует считать доказанным вовлечение в травматический процесс иммунокомпетентной системы организма, то патогенетическая роль серотонина остается до конца не выясненной.

Существенным звеном в реакции мозга на повреждение является изменение метаболизма нейромедиаторов и их рецепторных аппаратов. Это касается большинства нейромедиаторов: ацетилхолина, катехоламинов, моноаминов, возбуждающих нейромедиаторов (глутамата и аспартата). Последние играют особую роль в ближайшей реакции мозга на травму, активируя соответствующие рецепторы и способствуя поступлению и аккумуляции кальция в клетке. Увеличение внутриклеточного кальция выполняет триггерную функцию в активации внутриклеточных энзимов (протеаз и липаз), высвобождение свободных радикалов кислорода, перекиси липидов и деструкции клеток. Изменения энергетического обмена вследствие ишемии и гипоксии мозга при ЧМТ характеризуются преобладанием анаэробного гликолиза с развитием лактацидоза мозга, что способствует дальнейшим нарушениям мозгового кровотока и нарастанию отека мозга. При этом определены содержание лактата и лактатдегидрогеназы, церебрального изофермента креатинфосфокиназа, нейронспецифической эналазы, основного белка миелина, перекисных соединений в ликворе и оттекающей от мозга крови

могут служить биохимическими маркерами степени структурных и метаболических нарушений в мозге.

Поскольку ЧМТ развивается на фоне нарушения взаимодействия тех или иных нейромедиаторных систем мозга, то важным патогенетическим подходом для восстановления функций ЦНС представляется подбор и использование нейромодуляторных препаратов, направленных на регуляцию высвобождения нейромедиаторов и их связывание с рецепторами. Знание содержания тех или иных нейромедиаторов в головном мозге при экспериментальной трансплантации эмбриональной нервной ткани позволит ответить на вопрос об эффективности приживления трансплантата и восстановления нарушенных функций головного мозга.

1.3. Обоснование изучения содержимого нейромедиаторов норадреналина, дофамина, серотонина и их метаболитов в структурах головного мозга крыс при нейротрансплантации ФНТ

Биогенные амины (дофамин, норадреналин, адреналин, серотонин), которые выполняют в мозге функцию нейромедиаторов относятся к классу катехоламинов (дофамин, норадреналин, адреналин) и индоламинов (серотонин). Основным путем биосинтеза катехоламинов является их образование из фенилаланина через тирозин и ДОФА. Известно, что в разных отделах головного мозга скорость синтеза катехоламинов неодинакова. Ключевым ферментом синтеза катехоламинов является тирозингидроксилаза. Образование дофамина из ДОФА протекает с участием низко специфической декарбоксилазы ароматических аминокислот. Норадреналин образуется из дофамина под влиянием медьсодержащего белка дофамин-бета-оксидазы при участии аскорбиновой кислоты и кислорода. Катехоламины, в частности адреналин и норадреналин при их введении в желудочки мозга, субарахноидальное пространство, или сонную артерию вызывают ряд симптомов: аналгезию, ступор, нарушение координации движений. Внутрижелудочковое введение

катехоламинов приводит к торможению двигательной активности экспериментальных животных, к развитию снаподобных состояний, снижения безусловных защитных реакций, появлению каталепсии, развития комплекса вегетативных нарушений, которые можно рассматривать, как результат возбуждения парасимпатических центров. Кора больших полушарий при этом резко снижает функциональную активность. В то же время микроинъекции катехоламинов в определенные точки коры и ретикулярной формации вызывают тоническое усиление их биоэлектрической активности, которое сопровождается пробуждением животного, генерализованной реакцией кортикальной электрограммы, усилением биоэлектрической активности гипоталамуса и разных отделов ретикулярной формации. Считают, что отделы головного мозга, где содержание катехоламинов более высокое это – гипоталамус, ретикулярная формация, кора, гиппокамп имеют большую чувствительность к изменениям в содержимом катехоламинов в биологических средах, и к изменениям в метаболизме катехоламинов в мозге.

Мощнейшая модулирующая система головного мозга – норадреналинергическая (рис. 1.1). На уровне продолговатого мозга группы клеток А1 и А2 имеют проекции в гипоталамусе. Их функция в частности заключается в регуляции кардиоваскулярных и эндокринных функций. В участке моста расположены три группы норадреналинергических клеток А5, А6, А7. А5 и А7 дают проекции в спинной мозг и к другим нейромедоторным группам ствола мозга, при участии этих связей регулируются автономные рефлекс и ощущения боли. От группы клеток А6 (*locus ceruleus*) отходят мощные проекции к коре головного мозга, таламусу, гиппокампу, гипоталамусу, мозжечку, к другим нейромедиаторным группам ствола мозга и спинного мозга. От этих проекций зависит адекватная скорость реагирования на неожиданные сигналы от окружающей среды.

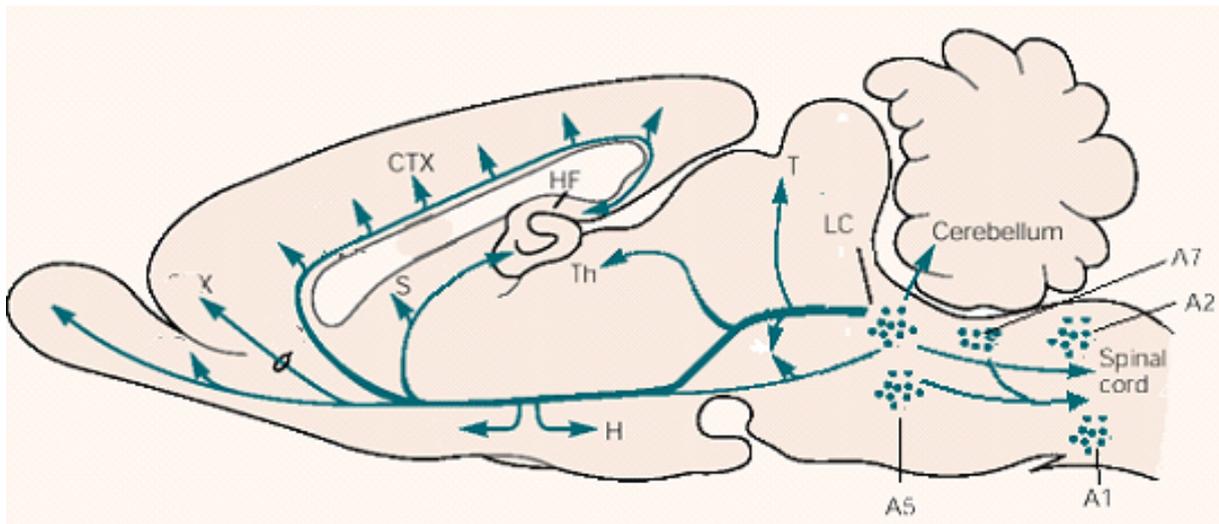


Рис.1.1. Норадренергические нейроны продолговатого мозга и моста. A5, A6 (LC locus ceruleus), A7- норадренергические группы нейронов моста; A1, A2 норадренергические группы нейронов продолговатого мозга.

Основные дофаминергические группы нейронов расположены в стволе головного мозга это A8-A14 (рис. 1.2).

От них отходят длинные дофаминергические проекции в разные структур мозга. Дофаминергические группы клеток A8-A10 (рис. 1.2) локализуются в среднем мозге.

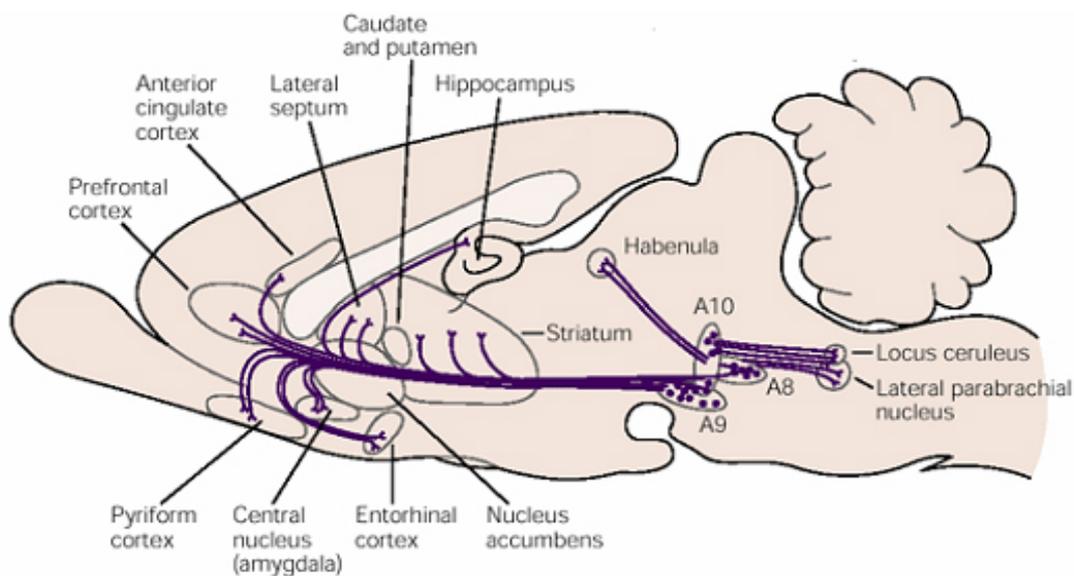


Рис. 1.2. Дофаминергические нейроны субстанции негра (A9), ретробульбарной зоны (A8) и вентральной тегментальной зоны (A10). От этих дофаминергических ядер начинаются главные дофаминергические проекции которые заканчиваются в стриатуме, фронтотемпоральной коре, и лимбической системе включая центральное ядро, амигдалу и латеральный септум.

Они включают клетки черной субстанции и клетки вентральной тегментальной зоны. От этих нейронов происходят дофаминергические проекции в стриатум (нигростриарный путь) которые имеют значение в реализации адекватного двигательного поведения. От А10 также происходят проекции во фронтальную и темпоральную часть коры и лимбические структуры (мезокортикальный и мезолимбический дофаминергический путь). Известно, что эти функциональные зоны мозга ответственны за эмоции и память. Группы дофаминергических клеток гипоталамуса А11 и А13 (рис. 1.3) дают проекции в спинной мозг и участвуют в регуляции симпатичных преганглионарных нейронов. Группы дофаминергических клеток А12 и А14 являются компонентами гипоталамической нейроэндокринной системы. Известно, что введение ДОФА - предшественника дофамина интактным животным вызывает значительные изменения в поведенческих реакциях.

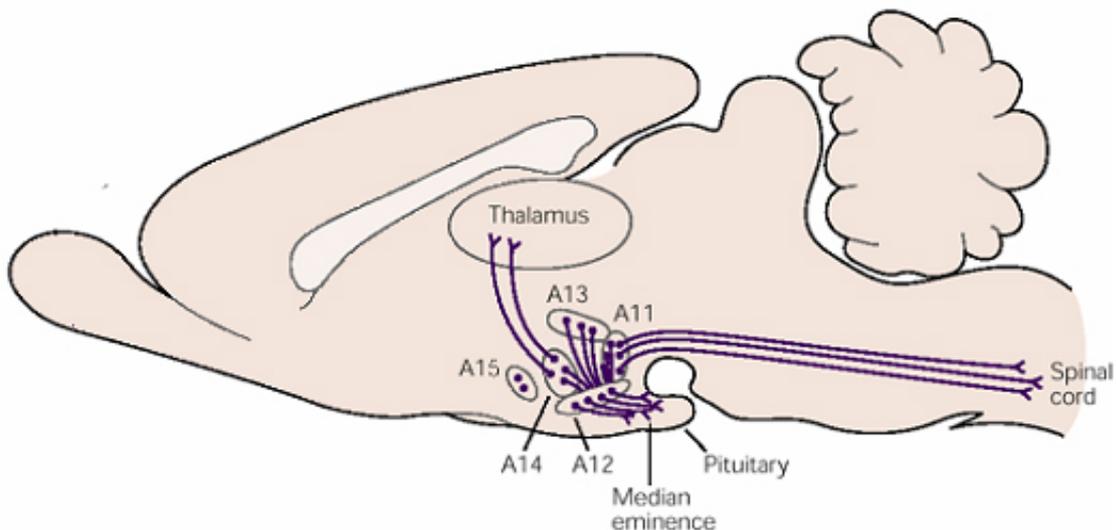


Рис. 1.3. Дофаминергические нейроны гипоталамуса А11 и А13 дают длинные проекции к ниже расположенным зонам ствола мозга и спинного мозга, а нейроны А12 и А14 участвуют в эндокринном контроле гипофиза.

Введение в больших дозах может вызывать катотоническое состояние, эрекцию, эякуляцию, саливацию, реакцию страха, отмечается повышение проворной активности и агрессивности у мышей. Известно также, что после ЧМТ регистрируются разнообразные нарушения среди которых нарушение

двигательного поведения, эмоционального состояния, когнитивных способностей, эндокринных функций. Очевидно, что причиной таких дисфункций после ЧМТ могут быть деструктивные процессы в дофаминергических нейронах и проекционных регуляторных путях.

Большинство серотонинергических нейронов локализовано вдоль средней линии ствола мозга (nuclei raphe) B1-B9 (). Группы серотонинергических клеток B1-B4 отсылают проекции в вегетативную и автономную (рис. 1.4) системы спинного мозга. При участии этих проекций в частности регулируется ощущение боли. Серотонинергические группы клеток моста мозга и среднего мозга B5-B9 отсылают проекции ко всем частям конечного мозга. Эти связи имеют значение для гипоталамической регуляции кардиоваскулярных функций, терморегуляции, а также для модуляции реакции кортикальных нейронов.

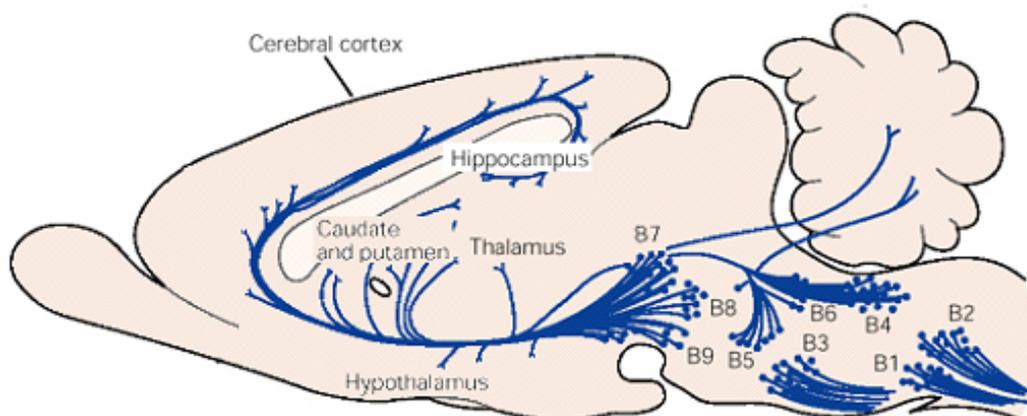


Рис. 1.4. Серотонинергические нейроны вдоль средней линии ствола мозга (nuclei raphe) B1-B9. Нейроны группы серотонинергических клеток B1-B4 дают проекции в нижние участки ствола мозга и в спинной мозг. Нейроны B4-9 дают проекции в высшие отделы ствола мозга, гипоталамус, таламус, кору головного мозга, хвостатое ядро, гиппокамп.

Серотонин в мозге синтезируется из триптофана в две стадии. Первая стадия - гидроксирование триптофана L -триптофан-5-гидроксилазой с образованием 5-окситриптофана, вторая стадия превращения 5-окситриптофана в 5-окситриптамин при участии декарбоксилазы ароматических аминокислот.

50% серотонина в мозге с участием моноаминоксидазы превращается в 5-оксииндолацетальдегид, который потом превращается в 5-оксииндолуксусную кислоту. На нейроны центральной нервной системы серотонин в основном действует тормозным путем. Тормозное действие серотонина отмечается в гипоталамусе, коре, гиппокампе, однако есть указания и на возбуждающее действие серотонина в некоторых структурах головного мозга.

Норадреналин в больших концентрациях содержится в гипоталамусе (1-3 мкг/г), значительно меньшее содержимое норадреналина в среднем, и продолговатом мозге, неокортексе, совсем низкое содержимое этого нейромедиатора в стриатуме. Высокая плотность норадреналинергических волокон наблюдается в гиппокампе.

Дофамин в мозге млекопитающих также распределяется неравномерно. Высокое содержание дофамина в стриопалидарном комплексе, более низкое в гипоталамусе, среднем и продолговатом мозге, гиппокампе и коре головного мозга.

Серотонин распространен в структурах ЦНС более равномерно, наиболее высокие его концентрации найдены в эпифизе где он играет еще не изученную до конца роль регулятора пейсмейкерных нейронов.

Таким образом, катехоламинергические и индоламинергические аксоны образуют мощную восходящую систему, которая начинается в области продолговатого мозга, среднего мозга, моста и заканчиваются на нейронах кортикальных, лимбических, стриопалидарных, гипоталамических и других участках головного мозга млекопитающих. Катехоламины и индоламины являются важным фактором интеграционной деятельности. Во многих исследованиях показано, что тЧМТ коренным образом изменяет метаболизм мозга и метаболизм нейромедиаторов в частности. Эти изменения и становятся причиной отдаленных последствий тЧМТ. Поэтому поиск коррекции основных нейромедиаторных систем мозга является первоочередной задачей нейрохирургии, а поиск новых методов, одним из которых является нейротрансплантация является оправданным и необходимым.

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) выполняет в ЦНС функцию торможения, количество этого тормозного нейромедиатора в головном мозге во много раз превышает количество других нейромедиаторов. Да, в гипоталамусе суммарное содержимое ацетилхолина, норадреналина, дофамина и серотонина не превышает 10 мкг/г, а содержимое ГАМК в этом отделе головного мозга представляет больше 600 мкг/г. ГАМК увеличивает проницаемость постсинаптических мембран для ионов K^+ и тем же отдалает мембранный потенциал от порогового уровня при котором возникает потенциал действия. ГАМК - эргические нейроны чаще всего это локальные ингибиторные клетки, которые имеют широкий спектр морфологических, биохимических, синаптических особенностей. Их тормозное действие в каждой структуре головного мозга имеет свои особенности, которые до сих пор до конца не изучены. Известно что недостаточность ГАМК - эргического обеспечения приводит к гипервозбудимости и гиперсинхронизму характерных для эпилептических состояний. Так, в частности, активность пирамидных нейронов гиппокампа находится под контролем ГАМК - эргических интернейронов и нарушение этого баланса является причиной когнитивных расстройств и эпилепсии [359]. В центре внимания современной науки базальные ганглии как наиважнейшие структуры, которые определяют двигательные расстройства. Последние исследования структуры и функции базальных ганглиев доказали важность ГАМК эргических интернейронов в координировании и регуляции сложной сетки взаимодействий в базальных ганглиях [363]. Нарушение ГАМК - эргической микроциркуляции приводит ко многим двигательным расстройствам, таких как, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, синдрому Tourette, дистонии [360].

Исследования на моделях шизофрении указывают, что нарушение ГАМК эргического ингибирования с последующим дисбалансом возбуждения и торможения приводит к когнитивному дефициту. А нарушение такого баланса в мозге людей к шизофрении [361, 362].

Таким образом, многочисленные нарушения функций организма которые

наблюдаются после ЧМТ могут быть вызваны возникновением дисбаланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в ЦНС.

1.4. Применение клеточных технологий для восстановления функции центральной нервной системы при нейрозаболеваниях и ЧМТ

В настоящее время прорыв в лечении неврологических расстройств после тЧМТ обоснованно связывают с развитием клеточных технологий. «Клеточная терапия» в современном понимании означает использование аутогенных, аллогенных или ксеногенных клеток в лечебных целях. Способность стволовых клеток, а также незрелых предшественников дифференцированных клеток размножаться и дифференцироваться в зависимости от микроокружения открывает новые возможности в лечении тЧМТ. Пересаженные клетки способны продуцировать нейротрофические факторы, а также вовлекать в процесс регенерации эндогенные нейральные клетки-предшественники. Для лечения имеет значение, что функциональная активность трансплантированных клеток способна создавать благоприятное микроокружение для восстановления поврежденных нейронов и может вносить замещение утраченных клеток новыми, функционально-активными донорскими клетками [37].

Возможность долговременного приживления аллогенных стволовых клеток в ткани мозга организма доказана многими исследователями [37, 129]. И в этом привлекательность ЦНС, которая изолирована от иммунной системы гематоэнцефалическим барьером и имеет ограниченную лимфоциркуляцию, что благоприятным образом сказывается на судьбе клеточного трансплантата, если, конечно, донор и реципиент не принадлежат к дискордантным по отношению друг другу видам [64, 140].

Источником пригодных для трансплантации нейральных стволовых клеток является фетальная нервная ткань. На экспериментальной модели повреждения головного мозга у крыс было показано, что трансплантация клеток, полученных из аллогенного фетального головного мозга, более эффективна в стимуляции

регенераторных процессов в сравнении с трансплантацией клеток, полученных из сингенного костного мозга взрослого животного [32].

С целью максимального приближения клеточных технологий к практической медицине рассматриваются вопросы оптимизации путей доставки клеток к очагам повреждения. Особенно привлекателен в этом отношении субарахноидальный (интратекальный) путь клеточной трансплантации. Этот путь является малотравматичным. Интратекальное введение клеток не требует дорогостоящего оборудования и может быть выполнено многократно. В экспериментах показано, что трансплантированные в субарахноидальное пространство стволовые клетки способны мигрировать в место повреждения мозга и интенсифицировать там репаративные процессы [53, 104, 135, 156]. В случаях, требующих экстренного хирургического вмешательства, наиболее подходящим может быть внутримозговой путь введения клеток. Показано, что донорские стволовые клетки, трансплантированные в неповрежденную часть мозга, способны мигрировать в очаг повреждения и там реализовывать свой репаративный потенциал [53, 104, 135, 156].

Актуальным вопросом нейротрансплантации является также выбор ткани. Традиционно считается, что наиболее эффективной является трансплантация гомологичного участка эмбрионной ткани в поврежденный участок ЦНС. Результаты исследований указывают на важность срока гестации эмбриона. Считается, что эмбриональная нервная ткань второго триместру гестации лучше интегрируется с тканью хозяина, чем эмбриональная ткань первого триместра. Для получения клеток для трансплантации авторы исследования предлагают культивирование нервных клеток второго триместра гестации. Причина такой разницы в интеграции в том, что во втором триместре формируются предшественники нервных клеток, которые могут быть дифференцированы в нейроны.

Другая важная проблема нейротрансплантации это прорастание трансплантата в ткань хозяина. Оказалось, что стимулирование трансплантированной ткани с помощью трофических факторов позволяет

модулировать прорастание этих клеток в необходимом направлении. Наиболее эффективным оказалось стимулирование эмбриональных клеток с помощью bFGF. Кроме того, оказалось, что bFGF значительно повышает плотность тирозингидроксилаза-позитивных нейронов. Такое же влияние на возобновление нормальной поведенческой реакции при моделировании болезни Паркинсона у крыс было получено при однократной инъекции 10-100 мкг рекомбинантного GDNF человека. Этот результат указывает на идентичность активных центров GDNF у млекопитающих. Специфичность GDNF по отношению к дофаминергическим нейронам черной субстанции было доказано также с использованием генетически модифицированных фибробластов, которые способны к гиперпродукции GDNF. Введение этих фибробластов супранигрально приводило к селективному выживанию дофаминергических нейронов, повышению экспрессии тирозингидроксилазы, и индукции роста отростков. Другая роль GDNF освещена в работе. Показано, что GDNF формирует дофаминергические связи трансплантата с тканью хозяина. Освещение значения GDNF для эффективного приживления и интеграции трансплантата в стриатуме побудило поиск возможности параллельного введения нейротрансплантата и этого фактора. Параллельное введение трансформируемых клеток и эмбриональной нервной ткани позволяет получить лучшие результаты приживления и прорастания дофаминергических аксонов в стриатум.

Клеточная трансплантация способна влиять на разные стороны функциональной деятельности ЦНС, поэтому она может быть применима при лечении неврологических расстройств, имеющих разный генез и проявления. Имеются данные, что билатеральная интрагиппокампальная аллотрансплантация фетальной нервной ткани крысам с разрушенными участками секторов CA1 и CA3 гиппокампа предупреждает повышение судорожной готовности мозга у большинства животных [37]. При химической деструкции пирамидных нейронов поля CA3 гиппокампа трансплантация нейральных стволовых клеток нормализует поведение путем восстановления высвобождения у-аминомасляной

кислоты (ГАМК), ацетил-холина и глутамата [16, 108]. При внутримозговой трансплантации культивированных незрелых глионейральных клеточных элементов отмечается улучшение выработки условного рефлекса [109]. При удалении лобной коры трансплантация культивированных астроцитов способствует восстановлению утраченных поведенческих навыков [98]. Трансплантация ткани фетального неокортекса улучшает когнитивную функцию мозга у крыс с врожденной микроцефалией [103].

В полной мере с экспериментальными данными согласуются результаты клинического применения трансплантации фетальных клеток у пострадавших с тЧМТ.

Согласно данным [18], эндолюмбальное введение фетальных клеток незрелой нервной ткани может быть эффективным методом лечения последствий черепно-мозговых травм у детей. С помощью этого метода значительное улучшение неврологического статуса может быть также достигнуто у детей с последствиями нейроинфекции [30, 33].

В частности, можно привести пример эффективного использования трансплантации фетальных клеток у пострадавших с тЧМТ, находившихся в состоянии комы II-III степени [28, 35, 138]. Проведенная у них интенсивная терапия позволила стабилизировать сердечно-сосудистую деятельность и дыхание, однако их сознание не восстанавливалось в течение 5-8 недель. У всех пациентов была высока вероятность формирования долговременного вегетативного статуса. Показаниями к трансплантационному лечению, наряду с клиническими проявлениями дисфункции головного мозга и очевидной неэффективностью традиционного лечения, явились значительные объективные изменения, выявленные при МРТ, ЭЭГ и транскраниальной ультразвуковой доплерографии (ТКУЗДГ). В большинстве случаев на МРТ определялись диффузно-атрофические изменения белого и серого вещества мозга. На ЭЭГ отмечалось снижение функциональной активности мозга с исчезновением ритма, при ТКУЗДГ - снижение линейной скорости мозгового кровотока в магистральных сосудах мозга и нарушения ауторегуляции кровотока.

Контрольная группа была сформирована по парному принципу. Каждому пациенту группы исследования был ретроспективно, случайным образом подобран контрольный пациент со сходными клиническими характеристиками. Пациенты обеих групп получали стандартное лечение примерно в одно и то же время и в одинаковых условиях.

Клеточную суспензию, состоящую из клеток, полученных из незрелых нервных и кроветворных тканей, вводили в субарахноидальное пространство реципиента через спинномозговой прокол. Летальность в контрольной группе составила 45 % (17 случаев), тогда как в группе исследования 5% (2 случая). Хороший исход заболевания, согласно шкале Глазго, был отмечен у 18 (47%) пациентов, получавших клеточную терапию, и ни у одного в контрольной группе. По данным 1,5-летнего наблюдения качество жизни больных, получивших клеточную терапию, значительно превосходило аналогичный показатель контрольной группы.

Результаты приведенного исследования свидетельствуют о целесообразности применения клеточной терапии у больных с тЧМТ уже в остром периоде заболевания, когда еще имеется возможность предупредить развитие необратимых вторичных изменений.

В литературе описаны случаи эффективного использования клеточных технологий не только в остром периоде ЧМТ, но и для лечения отдаленных последствий ЧМТ. Так на материале 65 пострадавших с тЧМТ было показано, что такая терапия позволяет значительно уменьшить выраженность посттравматического синдрома и расширить возможность последующей реабилитации [12]. Положительное влияние субарахноидальной нейротрансплантации на реабилитационную коррекцию неврологического статуса больных с последствиями ЧМТ было также отмечено и в других работах [20, 26, 78]. Недавно были представлены отдаленные результаты клеточной терапии 56 больных (19 женщин, 37 мужчин) в возрасте от 18 до 73 лет с последствиями ЧМТ в виде выраженного психоорганического синдрома [34]. На момент проведения лечения время после травмы не превышало 2 года. У всех

пациентов имел место кистозно-слипчивый арахноидит с явлениями атрофии больших полушарий и гидроцефалии. У 23 пациентов имелись субарахноидальные и у 11- внутримозговые кисты. В 10 случаях имел место трудно купируемый генерализованный судорожный синдром. Клеточную суспензию, состоящую из клеток, полученных из незрелых нервных и кроветворных тканей, трансплантировали субарахноидально 16 пациентам однократно, 32 двукратно и 8 - трехкратно. Клинический эффект разной степени выраженности в виде регресса общемозговых симптомов, снижения экстрапирамидного тонуса и улучшения в психоэмоциональной сфере был отмечен у всех пациентов. У 4 пациентов прекратились эпилептические припадки, что дало возможность полностью отменить антиконвульсанты через 3-4 месяца после проведенного лечения. У остальных больных с эписиндромом в течение 1,5 лет доза антиконвульсантов была снижена в 2-3 раза. Все без исключения пациенты объективно отмечали улучшение. Серьезных побочных эффектов клеточной терапии выявлено не было. Проведенное лечение позволило всем пациентам впоследствии значительно расширить круг реабилитационных мероприятий. В этом же исследовании было установлено, что у части пациентов клеточная терапия приводила к иммунной сенсibilизации по отношению к антигенам донора, выявляемой в тесте подавления миграции лейкоцитов. В то же время, признаков развития системных аутоиммунных реакций у пролеченных пациентов обнаружено не было. Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод, что клеточная терапия - это относительно безопасный метод лечения, который может быть использован при лечении отдаленных последствий ЧМТ.

Результатом спинальной травмы часто является тяжелая инвалидизация пациента, связанная с потерей чувствительности и двигательной активности ниже уровня повреждения. Регенерации поврежденного спинного мозга у млекопитающих и человека обычно не происходит, поэтому лечение спинальных больных в большинстве случаев не приносит желаемых результатов.

В литературе имеются описания случаев эффективного применения трансплантационной технологии в лечении последствий спинальной травмы [7,

14]. Разработана оригинальная технология лечения спинальной травмы, основанная на трансплантации фетальных клеток непосредственно в место повреждения спинного мозга [29]. Лечение по этой технологии состоит из трех этапов. На первом этапе жизнеспособные клетки помещаются в специальный плазматический сверток, в котором создается микроокружение, благоприятное для аксонального роста. На втором этапе выполняется операция, обеспечивающая доступ к дефекту спинного мозга. На заключительном этапе сверток с клетками помещается в дефект спинного мозга. Дальнейшее лечение включает в себя субарахноидальные клеточные трансплантации, назначение которых усилить клинический эффект трансплантационного лечения [128]. Согласно результатам такой терапии, неврологические улучшения разной степени выраженности были достигнуты более чем у половины пролеченных пациентов. Они начинали проявляться, как правило, не ранее, чем через 6 месяцев после трансплантационного лечения и развивались постепенно в течение длительного периода времени (3 года и более).

Таким образом, клеточная технология открывает новые возможности для эффективного лечения пациентов с последствиями спинальной травмы. Представляется важным, что значительные неврологические улучшения могут быть достигнуты не только у недавно травмированных пациентов, но также у пациентов с давностью заболевания 1,5 года и более, которые с позиций общепринятой медицины являются инкурабельными.

Резюме:

1. После тЧМТ в нервной ткани инициируются процессы апоптоза и некроза, которые приводят к образованию клеточного дефицита;
2. Клеточный дефицит после тЧМТ в тканях мозга распределен диффузно;
3. тЧМТ приводит к патологической реакции со стороны всех нервных клеток мозга: нейронов, глии, микроглии, миелина;
4. Наиболее чувствительными к травмированию являются отростки нейронов, в отличие от тел нейронов, которые более стойкие к повреждениям после тЧМТ;
5. Существенным звеном в реакции мозга на повреждение является

изменение метаболизма нейромедиаторов и их рецепторных аппаратов;

6. Современная медицина не владеет эффективной методикой предотвращения разрушения нейронов и интеграционных связей после тЧМТ;

7. Для лечения неврологических расстройств после тЧМТ целесообразно применять клеточные технологии; механизм действия трансплантированных клеток на головной мозг является комплексным;

8. Лечебный эффект трансплантированных клеток связан с продукцией этими клетками нейротрофических факторов, а также медиаторов, стимулирующих неоваскулогенез и улучшающих мозговую гемодинамику. Нейротрофические факторы способны стимулировать функциональную активность нервных клеток, активировать работу разных отделов мозга и создавать благоприятные условия для роста и миелинизации нервных окончаний;

9. Содержание тех или иных нейромедиаторов в головном мозге при экспериментальной трансплантации эмбриональной нервной ткани отражает о эффективность приживления трансплантата и восстановление нарушенных функций головного мозга;

10. Фетальные клетки в силу своей низкой дифференцированности и высокой пластичности обладают уникальными свойствами, которые могут быть эффективно использованы при лечении многих тяжелых заболеваний, в том числе и тЧМТ. Препятствия на пути их применения носят, в основном, этический характер;

11. В полной мере с экспериментальными данными согласуются результаты клинического применения трансплантации фетальных клеток у пострадавших с тЧМТ;

12. Клеточные технологии открывают новые возможности для эффективного лечения пациентов с последствиями тЧМТ и спинальной травмы. Значительные неврологические улучшения могут быть достигнуты не только у недавно травмированных пациентов, но также у пациентов с давностью заболевания 1,5 года и более, которые с позиций общепринятой медицины являются инкурабельными.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальные животные

В исследованиях использовали 98 беспородных половозрелых белых крыс самцов массой 180 - 220 г, а также беременных самок с 18-дневными эмбрионами.

2.2. Модель тяжелой ЧМТ

При моделировании т ЧМТ дозированная травма наносилась в левый теменно-височный участок головы крысы с помощью пружинного ударника, модифицированного нами для нанесения травм малым лабораторным животным (рис. 2.1) [рац. предложение N392].

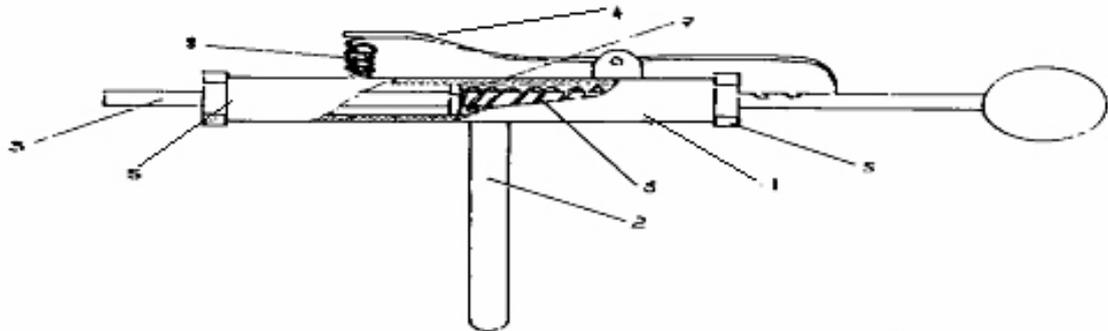


Рис. 2.1 Схема ударника для нанесения дозированной ЧМТ мелким экспериментальным животным. 1-Корпус ударника; 2-Ручка; 3-Ударный стержень; 4-Спусковой крючок; 5-Фиксирующая заглушка корпуса; 6-Пружина ударника; 7-Фиксатор пружины; 8-Пружина спускового механизма.

Выбор метода травмирования обусловлен его наибольшим соответствием виду травмирования, которое чаще всего встречается в естественных условиях. При таком повреждении происходит разрушение ткани мозга и сотрясение головного мозга, а также осуществляется выброс нейромедиаторов и нарушение

нейродинамики. При выборе вида травмирования важным было то, что при использовании данной модели у животных развиваются глубокие и продолжительные изменения в нейромедиаторном обеспечении интеграционной деятельности головного мозга. Именно эти изменения с нашей точки зрения являются причиной травматической болезни в отдаленном периоде после травмирования.

При нанесении травмы для смягчения контрудара голову животного фиксировали на мягкой поролоновой подкладке. Тяжесть травмы была отработана в предыдущих экспериментах, в которых применяли морфологические методы. Период арефлексии и апноэ после травмы у крыс длился 60 -100 с. Потом в течение одних-двух суток наблюдался парез одной или обеих контрлатеральных конечностей. Макроскопически травма характеризовалась вдавленным переломом костей крыши черепа и формированием массивного посттравматического дефекта с проникновением крови в вещество мозга. Наличие ушиба фиксировали при открытии черепа. Размеры повреждения ткани травмированного полушария составляли приблизительно $5 \times 5 \text{ мм}^2$ в сенсомоторном участке коры, в ткани обоих полушарий отмечались характерные кровоизлияния (рис.2.2).

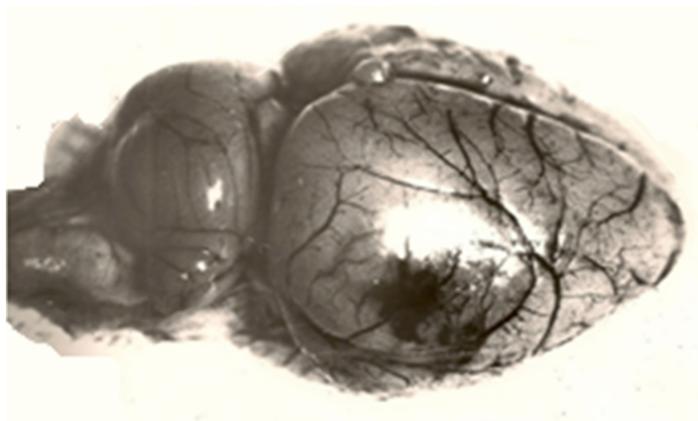


Рис.2.2. Ушиб мозга в теменной доле конвексимально. Зона ушиба с неровными краями имbibированная кровью. В перифокальной зоне ушиба петехиальные кровоизлияния, полнокровие артерий паутинной оболочки.

Через 2 часа после нанесения травмы животным, которые входили в состав группы сравнения (только тЧМТ), проводили хирургическую операцию по удалению тканевого детрита. У животных других групп удаления тканевого детрита проводили непосредственно перед трансплантацией. Для исследования влияния отсроченной трансплантации удаления детрита также проводили перед трансплантацией, однако через 5 суток после нанесения экспериментальной ЧМТ.

Во всех экспериментальных группах животных в течение 30 суток наблюдалась гибель 30% животных. Исследование мозга таких животных показало, что их гибель наступала в результате деструктивного отека головного мозга, легких и кровоизлияний в диэнцефальный и мезенцефальный отделы головного мозга.

2.3. Обоснование технологии трансплантации фрагментов ФНТ и модели трансплантации

Считается, что трансплантация фрагментов ФНТ является наиболее эффективной в виду возможности возобновления функциональных связей между клетками. И хотя во многих исследованиях доказано, что трансплантация суспендированных эмбриональных клеток не менее эффективна, чем фрагментов ФНТ, методы имплантации этих фрагментов постоянно совершенствуются. В частности показано, что срезы ФНТ с использованием "Roller drum" метода можно хранить в течение 1 недели [370]. При этом количество дофаминергических нейронов ощутимо не снижается. Были проведены также исследования влияния криоконсервации фрагментов ФНТ на ее способность приживаться и возобновлять поведенческие реакции на модели болезни Паркинсона. Исследователи установили, что при соответствующей обработке фрагментов ганглиозидом GM1 фрагменты ФНТ можно хранить неограниченное время в жидком азоте, после чего они не теряют своих высоких регенеративных свойств [371].

Поскольку экспериментальные исследования в отрасли нейротрансплантологии посвящены в подавляющем числе случаев изучению эффектов при болезни Паркинсона, Хантингтона и демиелинизирующих болезнях, наши исследования влияния нейротрансплантации при тЧМТ являются пионерскими. Опыта в трансплантации ФНТ в неокортекс не существует. Поэтому при создании экспериментальной модели трансплантации при ЧМТ мы пользовались опытом, приобретенным среди экспериментаторов, которые отработывали модель нейротрансплантации при болезни Паркинсона.

Важным вопросом при создании экспериментальной модели был выбор типа трансплантата. Исследования специфичности эффекта в зависимости от вида трансплантированной ткани при моделировании болезни Паркинсона указывают, что наиболее специфическими результаты возобновления функций и эффективными в плане приживания являются аллогенные трансплантаты [372]. Было показано, что клетки аллогенного трансплантата выживают на 69%, а гетерологичного на 12%. В культуре же эти клетки демонстрировали одинаковую жизнеспособность.

Для решения вопроса о возможности возобновления интеграционных связей после ЧМТ за счет трансплантации фетальной гомологичной ткани мы использовали свежепрепарированную фетальную ткань гомологичного участка коры 18-и дневных крыс.

Для получения ФНТ использовали беременных самок крыс. На 18 день беременности самкам – донорам под глубоким нембуталовым наркозом делали разрез брюшной полости. Плоды последовательно доставали из дистального конца матки. Мозг плода фиксировали иглами на пенопласте, закрепленном на дне бикса, заполненного стерильной средой "Игла" при комнатной температуре. С помощью микроинструментов снимали оболочки, которые покрывали мозг. По латеральной части полушария под стереомикроскопом делали продольный разрез. После этого в верхней части неокортекса проводили поясничный разрез коры и, отступив на 1 мм от середины мозга, вырезали прямоугольный кусочек ткани - 1x2 мм. Полученный фрагмент сенсомоторной коры 18-и дневных

эмбрионов оставался в среде N 199 (Институт полиомиелитов и вирусных энцефалитов, Россия) не больше 40 мин.

Мышечную фетальную ткань получали из передней поверхности бедра тех же эмбрионов.

Трансплантацию проводили с помощью приспособления, которое состояло из микровинта, который был жестко скреплен с поршнем шприца Гамильтона. К шприцу была присоединена полихлорвиниловая трубка со стеклянной канюлей на конце. Вся система была заполнена культуральной средой N199. С помощью микровинта кусочек эмбрионной ткани всасывался в кончик стеклянной канюли, которой потом вводился в полость, которая образовывалась в неокортексе реципиента. Введение проводилось после хирургической обработки макроскопически измененной травмированной мозговой ткани.

Трансплантацию ФНТ мы проводили через 2 часа после травмы. Операцию выполняли под нембуталовым наркозом - 4 мг/ 100г живого веса. В отдельной группе животных хирургическую обработку и введение 2 мм^3 трансплантата мы проводили через 5 суток после нанесения ЧМТ. Эта группа животных была создана для выяснения вопроса об эффективности введения трансплантата в зону мозга с развитым деструктивным процессом.

Трансплантацию эмбрионной мышечной ткани проводили аналогично трансплантации ФНТ.

2.4. Обоснование технологий трансплантации суспензии нервной ткани

В литературе для трансплантации в глубинные структуры мозга используют эмбрионную ткань, обработанную трипсином или суспендированную механическим способом. Исследования жизнеспособности суспендированных нейронов из разных участков мозга показывают, что диссоциированные нейроны ЦНС хранят жизнеспособность в течение нескольких часов даже в простом глюкозо-солевом растворе при комнатной температуре. При этом жизнеспособность нейронов мезенцефалона снижается

быстрее, чем суспендированных нейронов стриатума и коры, большую жизнеспособность имеют также нейроны полученные из эмбрионов на ранних стадиях развития [375]. Исследования также показывают хорошую корреляцию между жизнеспособностью нейронов *in vitro* и их выживанием после трансплантации. Отмечается, что введение суспензии нервных клеток внутривнутрипаренхимально дает наилучшие результаты приживления и возобновления реиннервации в поврежденных участках мозга [375]. Считается, что именно внутримозговая трансплантация суспензии нервных клеток способствует наиболее эффективной и полной реиннервации и возобновлению функций [375].

В экспериментальных исследованиях также рассматривался вопрос о способах хранения диссоциированной эмбрионной ткани. Доказано, что свежая диссоциированная ткань наиболее эффективна для возобновления функций и приживления. Криоконсервированная нервная ткань имеет значительно меньшую эффективность и жизнеспособность [376]. Однако, следует заметить, что на сегодня поиски методов консервирования эмбрионной ткани ведутся, они не закончены, но эффективных нет. Хорошие результаты получены при хранении суспензии в так называемой "hibernation medium" при +4°C. Там нервные клетки не теряют своих свойств в течение 8-12 суток [377].

2.5. Экспериментальная модель имплантации суспензии нервных клеток после тЧМТ

Для нашей экспериментальной модели использовали суспензию клеток ФНТ сенсомоторного участка коры мозга 18-и дневных эмбрионов крыс. Непосредственно перед использованием ФНТ сенсомоторной коры суспендировали в питательной среде 199, центрифуговали на центрифуге ОПН-8 при 1500 о/мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали в питательной среде и определяли концентрацию живых нервных клеток. Для трансплантации использовали 5-10 млн живых клеток.

После удаления тканевого детрита, который образовывался в травмированном участке, в лунку после хирургической обработки вводили эмбрионные нервные клетки в виде суспензии (5-10 млн клеток). Для анестезии применяли нембутал (4 мг/100г живого веса).

Животных экспериментальных групп декапитировали через 30 суток после нанесения травмы и трансплантации одновременно с животными контрольной группы. После забоя животного максимально быстро удаляли мозговую ткань и замораживали ее в жидком азоте.

2.6. Экспериментальные группы (98 крыс) .

Интактные животные:

- У 15 животных - исследовали содержание дофамина, норадреналина и серотонина в левом, правом полушарии и диэнцефально-стволовом отделе головного мозга;

- У 10 животных - исследовали содержание норадреналина, дофамина, гомованилиновой кислоты, серотонина, 5-гидроксииндолуксусной кислоты, гамма-аминомасляной кислоты в коре левого полушария, правого полушария, гиппокампе, гипоталамусе, стриатуме, продолговатом и среднем мозге;

Группа сравнения (животные с тяжелой ЧМТ):

- У 15 животных - исследовали содержание дофамина, норадреналина и серотонина в левом, правом полушарии и диэнцефально-ствольном отделе головного мозга;

- У 10 животных - исследовали содержание норадреналина, дофамина, гомованилиновой кислоты, серотонина, 5-гидроксииндолуксусной кислоты, гама-аминомасляной кислоты в коре левого полушария, правого полушария, гиппокампе, гипоталамусе, стриатуме, продолговатом и среднем мозге;

Основная группа (животные с тяжелой ЧМТ и с трансплантированной фетальной тканью):

- Первая подгруппа животных, которым через 2 часа после тЧМТ

трансплантировали ФНТ и исследовали содержание норадреналина, дофамина, гомованилиновой кислоты, серотонина, 5-гидроксииндолуксусной кислоты, гама-аминомасляной кислоты в коре левого полушария, правого полушария, гиппокампе, гипоталамусе, стриатуме, продолговатом и среднем мозге - 12 животных (тЧМТ+ тФНТ);

- Вторая подгруппа животных, которым через 5 суток после травмирования трансплантировали ФНТ и исследовали содержание норадреналина, дофамина, гомованилиновой кислоты, серотонина, 5-гидроксииндолуксусной кислоты, гамма-аминомасляной кислоты в коре левого полушария, правого полушария, гиппокампе, гипоталамусе, стриатуме, продолговатом и среднем мозге - 12 животных (тЧМТ+ФНТ через 5 суток);

- Третья подгруппа животных, которым через 2 часа после тЧМТ вводили суспензию нервных клеток из сенсомоторной коры головного мозга 18 – и дневных эмбрионов и исследовали содержание дофамина, норадреналина и серотонина в левом, правом полушарии и диэнцефально-ствольном отделе головного мозга - 12 животных (тЧМТ+суспензия ФНТ);

- Четвертая подгруппа животных, которым через 2 часа после тЧМТ трансплантировали мышечную ткань 18 – и дневных эмбрионов и исследовали содержание дофамина, норадреналина и серотонина в левом, правом полушарии и диэнцефально-ствольном отделе головного мозга - 12 животных (тЧМТ+ФМТ).

2.7. Обоснование изучения содержания нейромедиаторов норадреналина, дофамина, серотонина и их метаболитов в структурах головного мозга крыс при нейротрансплантации фетальной ткани

Биогенные амины (дофамин, норадреналин, адреналин, серотонин), которые выполняют в мозге функцию нейромедиаторов относятся к классу катехоламинов (дофамин, норадреналин, адреналин) и индоламинов (серотонин). Основным путем биосинтеза катехоламинов является их образование из

фенилаланина через тирозин и ДОФА. Известно, что в разных отделах головного мозга скорость синтеза катехоламинов неодинакова. Ключевым ферментом синтеза катехоламинов является тирозингидроксилаза. Образование дофамина из ДОФА протекает с участием низко специфической декарбоксилазы ароматических аминокислот. Норадреналин образуется из дофамина под влиянием медьсодержащего белка дофамин-бета-оксидазы при участии аскорбиновой кислоты и кислорода. Катехоламины, в частности, адреналин и норадреналин при их введении в желудочки мозга, субарахноидальное пространство, или в сонную артерию вызывают ряд симптомов - аналгезию, ступор, нарушение координации движений. Внутрижелудочковое введение катехоламинов приводит к торможению двигательной активности экспериментальных животных, к развитию снопоподобного состояния, снижению безусловных - защитных реакций, появлению каталепсии, развитию комплекса вегетативных нарушений, которые можно рассматривать, как результат возбуждения парасимпатических центров. Кора больших полушарий при этом резко снижает свою функциональную активность. В то же время микроинъекции катехоламинов в определенные точки коры и ретикулярной формации вызывают тоническое усиление их биоэлектрической активности, которое сопровождается пробуждением животного, генерализованной реакцией кортикальной электрограммы, усилением биоэлектрической активности гипоталамусу и разных отделов ретикулярной формации. Считают, что отделы головного мозга, где содержится катехоламинов более высоко, это - гипоталамус, ретикулярная формация, кора, гиппокамп.

Норадреналин в больших концентрациях содержится в гипоталамусе (1-3 мкг/г), значительно меньшее его количество имеется в среднем, и продолговатом мозге, неокортексе, совсем низкое - в стриатуме. Высокая плотность норадреналинергических волокон наблюдается в гиппокампе.

Дофамин в мозге млекопитающих также распределяется неравномерно. Высокое содержание дофамина находится в стриопалидарном комплексе, более низкое - в гипоталамусе, среднем и продолговатом мозге, гиппокампе и коре

головного мозга.

Серотонин распространен в структурах ЦНС более равномерно, наиболее высокие его концентрации найдены в эпифизе, где он играет еще не изученную до конца роль регулятора пейсмейкерных нейронов.

Таким образом, катехоламинергические и индоламинергические аксоны образуют мощную восходящую систему, которая начинается в области продолговатого мозга, среднего мозга, моста и заканчиваются на нейронах неокортикальных, лимбических, стриопалидарных, гипоталамических и других участках головного мозга млекопитающих. Катехоламины и индоламины являются важными факторами интеграционной деятельности мозга. Во многих исследованиях показано, что тЧМТ коренным образом изменяет метаболизм мозга и, в частности, метаболизм нейромедиаторов. Эти изменения и становятся причиной отдаленных последствий тЧМТ. Поэтому поиск коррекции основных нейромедиаторных систем мозга есть первоочередная задача нейрохирургии, а поиск новых методов, одним из которых является нейротрансплантация, является оправданным и необходимым.

Для исследования изменений в содержании катехоламинов и индол аминов после тЧМТ и влиянию на нейромедиаторный обмен трансплантации фетальных нервных клеток (гомологичных участков коры 18 дневных эмбрионов, суспензии нервных клеток гомологичных участков коры 18 дневных эмбрионов, 2 мм³ мышечной ткани и трансплантации гомологичных участков коры 18 дневных эмбрионов через 5 часов после тЧМТ) мы изучили участки мозга, которые содержат моноаминергические группы нейронов. Такими участками явились полушария головного мозга (левое травмированное и правое), и диэнцефально-стволовой отдел головного мозга (таламус, гипоталамус, средний мозг, мост и продолговатый мозг).

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) в ЦНС выполняет функцию торможения. Количество этого тормозного нейромедиатора в головном мозге во много раз превышает количество других нейромедиаторов. Так, в гипоталамусе суммарное содержимое ацетилхолина, норадреналина, дофамина и серотонина

не превышает 10 мкг/г, а содержание ГАМК в этом отделе головного мозга больше 600 мкг/г. ГАМК увеличивает проницаемость постсинаптических мембран для ионов K^+ . Тормозное действие ГАМК эргических нейроны в каждой структуре головного мозга имеет свои особенности которые до сих пор до конца не изучены. Известно, что недостаточность ГАМК системы приводит к гипервозбудимости и развитию эпилепсии [359]. Исследования на моделях шизофрении указывают, что нарушение ГАМК- эргического ингибирования с последующим дисбалансом возбуждения и торможения приводит к когнитивному дефициту [361, 362].

Таким образом, многочисленные нарушения функций организма, которые наблюдаются после ЧТМ, могут в том числе быть вызваны и возникновением дисбаланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в ЦНС.

2.8. Приготовление образцов тканей мозга для определения биогенных аминов

Через 30 суток после нанесения ЧМТ животных умерщвляли путем декапитации. Процедура получения тканей головного мозга продолжалась не больше 7 минут. Из головного мозга (руководствуясь фотографиями атласа) выделяли участки коры левого полушария, правого полушария, гиппокампа, гипоталамуса, стриатума, продолговатого и среднего мозга. Выделенные структуры сразу замораживали в жидком азоте. Полученные образцы хранили к моменту исследований при $-40^{\circ}C$.

2.9. Определение содержания катехоламинов и их производных в нервной ткани головного мозга крыс методом высокоэффективной хроматографии с электрохимической детекцией

Принцип метода заключается в хроматографическом разделении смеси катехоламинов ткани мозга, предварительно экстрагированных в 0,1 М $HClO_4$

кислоте, и последующем электрохимическом детектировании (благодаря способности катехоламинов окисляться при потенциале 0,5-1,0 V).

Реактивы: 0,1М HClO₄ на бидистиллированной воде и 0,2М HClO₄. Все навески для приготовления стандартных растворов были производства фирмы "Janssen Chimica", Бельгия. Их готовили на 0,1М HClO₄ в концентрации 2 мкг/мл и хранили при температуре – 2 градусов Цельсия. Рабочие растворы катехоламинов и их производных готовили раз в неделю и хранили при 4 градусах Цельсия. Рабочий раствор стандартов являл собой смесь по 100 нг/мл норадреналина, дофамина, гомованилиновой кислоты, 5 гидроксииндолуксусной кислоты. Рабочий раствор внутреннего стандарта содержал 100 нг/мл ДГБА. 5% Na₂ - ЕДТА. Подвижная фаза состояла из 0,03М KН₂РO₄ и 0,03М лимонной кислоты (рН 4,86) и содержала на 100 мл - 50 мг октилсульфоната натрия, 25 мг Na₂ -ЕДТА, 7-15 мл ацетонитрила.

Специальное оборудование: центрифуга ОПН- 8, хроматограф жидкостный микроколоночный "Милихром".

Ход работы. Экстракцию катехоламинов проводили в 0,1М HClO₄. Материал фильтровали через микрофильтры с диаметром пор 0,2 мкм. 10 мкл супернатанта наносили на колонку.

Условия хроматографирования: колонка Silasorb C- 8 (2x60 мм), скорость потока - 100 мкл/хв, потенциал рабочего электрода - 0,75В.

Высокая чувствительность методики позволяла качественно изучить содержание нейромедиаторов и их производных в выбранных структурах головного мозга.

2.10. Определение содержания серотонин в нервной ткани головного мозга крыс методом высокоэффективной хроматографии с электрохимической детекцией

Принцип метода заключается в хроматографическом разделении смеси индоламинов и их электрохимическом детектировании (благодаря их

способности окисляться при потенциале 0,4-0,7V).

Реактивы: 1М HClO₄ на бидистиллированной воде, 0,2М HClO₄. Стандартный раствор серотонина и N -метил готовили на 0,1М HClO₄ в концентрации 2 мкг/мл и хранили при температуре – 2 градуса Цельсия. Рабочие раствор (100 нг/мл) готовили на 0,1М HClO₄ 1 раз в неделю и хранили при 4 градусах Цельсия. Подвижная фаза состояла из 0,03М KН₂РO₄ и 0,03М лимонной кислоты (рН 4,86) и содержала на 100 мл - 50 мг октилсульфоната натрия, 25 мг Na₂ -ЕДТА, 15 мл ацетонитрила.

Специальное оборудование: центрифуга ОПН- 8, хроматограф жидкостный микроколоночный "Милихром", набор для микрофльтрации с мембранами 0,2 мкм. Ход работы. Экстракцию серотонина проводили в 0,1М HClO₄. 10 мкл супернатанта наносили на колонку. Для экстракции до 100 мг ткани добавляли 900 мкл 1М HClO₄ и N -метил-серотонин как внутренний стандарт. Смесь гомогенизировали и центрифугировали при 7000 о/мин в течение 10 мин. Супернатант получали при 2000 о/мин в течение 5 мин. 10 мкл прозрачного микрофилтрат хроматографировали.

Условия хроматографирования: колонка Silasorb C- 8 (2*60 мм), скорость потока - 100 мкл/мин, потенциал рабочего электрода - 0,75В. Подвижная фаза состояла из 0,03М KН₂РO₄ и 0,03М лимонной кислоты (рН 4,86) октилсульфоната натрия, Na₂ -ЕДТА и ацетонитрила.

Идентификацию проводили по времени выхода пиков соответствующих стандартов индоламинов фирмы "Janssen Chimica" (Бельгия). Для расчета концентрации серотонина в образцах находили отношение высоты пика серотонина к высоте пика внутреннего стандарта известной концентрации.

Использованные нами способы хроматографического разделения и идентификации серотонина позволили корректно изучить его содержание в структурах головного мозга.

2.11. Определение содержания гамма-аминомасляной кислоты в нервной ткани головного мозга крыс

Принцип метода основывается на образовании высокофлюоресцентного продукта при взаимодействии ГАМК при высоких значениях pH с ортофталевым альдегидом и меркаптоэтанолом.

Реактивы: 5н K_2CO_3 , 2н $NaOH$, 2н HCl , 1% Na_2 - ЭДТА, 0,1% Na_2 - ЭДТА, 0,8н $HClO_4$, 10% $Na_2S_2O_5$, 0.1М фосфатный буфер, pH 6.5.

Специальное оборудование: центрифуга ОПН- 8, флуориметр "Квант" (Россия).

Ход работы. Для экстракции ГАМК до 100 мг ткани добавляли 1мл смеси, которая содержала 10 мл 0,8н $HClO_4$, 0,1мл 10% $Na_2S_2O_5$ и 0,2 мл 20% Na_2 – ЭДТА. Далее раствор центрифугировали при 7000g и 4 градусах Цельсия в течение 5 мин. Супернатант фильтровали.

ГАМК очищали колоночной хроматографией на сильном катионообменнике Dowex 50. Колонку промывали 20 мл 2н $NaOH$, 1% Na_2 - ЭДТА, водой к pH 7.0. Затем колонку промывали 20 мл 2н HCl и водой к pH 7.0. Уравновешивали колонку 20 мл 0.1М фосфатного буфера, pH 6.5. Размер колонки - 4.0 мм*75 мм. Перед началом работы на колонке через нее пропускали 5 мл воды.

Супернатант пропускали через колонку со скоростью не больше 0,25мл/мин. Потом колонку обрабатывали следующим образом:

- а) 10 мл воды;
- б) 10 мл 0,02М цитратного буфера, pH 4,0;
- в) 1 мл 0,05 М цитратного буфера, pH 5, 2;
- г) 3 мл 0,05 М цитратного буфера, pH 5,2;
- д) 3 мл 0,05 М цитратного буфера, pH 5,2.

Фракции «г» и « д» собирали в градуированные пробирки для определения ГАМК. Воду, 0,02 М цитратный буфер, pH 4,0 и 0,05 М цитратный буфер, pH 5,2 пропускали через колонку со скоростью 0,4 мл/мин, 0,2 мл/мин и 0,1 мл/мин

соответственно. Элюаты хранили при – 2 градусах Цельсия в течение 2-х дней.

Флуоресценцию, которая развивается в течение 30 минут, измеряли на флуориметре "Квант" (Россия) при длине волны 335/455 нм.

2.12. Определение активности апоптоза в нервной ткани

Для определения уровня экспрессии гена Вах, по которому судили о выраженности апоптоза в нервной ткани, осуществляли экстракцию РНК фенольным методом в присутствии детергентов и ингибиторов нуклеаз [22]. кДНК синтезировали с использованием 1-2 мкг РНК и 100 нг олиго(дЕ)12-18 в 10 мкл раствора, содержащего 50 ммоль Трис-НСД, рН 8,3, 75 ммоль КСД, 3 ммоль MgCl₂, 50 ммоль дитиотрейтола, смесь дНТФ (1 ммоль каждого) и 200 ед M-Mlv обратной транскриптазы (рекомбинантной). Для определения экспрессии гена Вах использовали праймеры – 5'-CACCAGCTCTGAACAGATCATGA-3' и 5'-TCAGCCCATCTTCTTCCAGATGGT-3' [23], продукт амплификации осуществляли при температуре отжига 55°C. Визуализацию продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

2.13. Определение количества фосфолипидов в мозговой ткани

Учитывая липидную природу нервной ткани, характеризующуюся высоким содержанием и разнообразием липидных соединений, в значительной мере определяющих ее морфологическую гетерогенность, метаболизм и функциональную активность, а также то, что фосфолипиды являются одним из наиболее важных компонентов клеточных мембран, вторичных месенджеров и биологически активных соединений, участвующих в механизмах синаптической трансмиссии, мы провели и их определение. В тканях мозга определяли основные фракции фосфолипидов: фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноamina, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, сфингомиелина. Содержание фракций фосфолипидов определяли методом тонкослойной хроматографии на

пластинах фирмы «Хийа Келур» (Эстония) [21]. Для определения содержания липидных фракций пластины сканировали на денситометре «Kamag» (США).

2.14. Статистические методы исследования

Статистическая обработка результатов исследования была проведена на персональном компьютере под управлением операционной системы Windows XP.

Полученные в результате исследования выборки данных были проверены на соответствие законам нормального (Гаусовского) распределения с применением программного пакета Statistica 6.0 for Windows. Средствами того же пакета выборки данных были обработаны, в результате чего были получены средние величины (M) и их ошибки (m). Для выявления эксцессов в полученных выборках данных была применена программная среда SPSS 10.0 [16, 62].

Достоверность различий между парными выборками данных определялась с применением критерия Стьюдента. Нулевой гипотезой в нашем исследовании мы считали предположение о том, что изучаемые выборки идентичны, а имеющиеся различия – случайны. Пары выборок данных, занесенные в базу данных программы Stadia for DOS, средствами этой программы были проверены на предмет выявления статистически достоверных различий между ними. Различия между парными выборками считались статистически достоверными при вероятности нулевой гипотезы менее 5%. Поскольку все данные в полученных выборках подчинялись законам нормального распределения, непараметрические методы статистического исследования не применялись.

Рисунки, графически демонстрирующие взаимосвязь между различными показателями, были получены с применением программы Excel из пакета MS Office 2003 [13].

РАЗДЕЛ III

РОЛЬ АПОПТОЗА И НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ФОСФОЛИПИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Неврологический дефицит при тяжелой ЧМТ (тЧМТ) формируется в результате гибели клеток после воздействия травмирующего фактора, а также в связи с активацией воспаления, ишемии и апоптоза клеток [39, 89]. Этот дефицит обуславливает значительные посттравматические изменения в организме, поскольку ведет к выпадению интеграционных взаимодействий и формированию разнообразных отдаленных последствий травмы [66]. Ему способствует нарушение обмена фосфолипидов, входящих в структуру клеточных мембран и вторичных мессенджеров [31]. Особенно чувствительны ко всем видам повреждения нейроны интегрирующих – дофаминергической, норадренаминергической и серотонинергической систем мозга [99, 152]. Выборочная стимуляция экспрессии генов нейротрофических факторов и активация репарационных процессов, таких как нейрогенез и синаптогенез, способствуют восстановлению функций ЦНС после ЧМТ [72, 88, 96].

Настоящий фрагмент исследования проведен с целью определения патогенетической значимости апоптоза и нарушения фосфолипидного обмена в формировании неврологического дефицита при тяжелой черепно-мозговой травме.

В исследовании использовали самцов беспородных половозрелых крыс массой тела 180-220 г. Для оценки результатов эксперимента выделены контрольная группа (10 интактных животных) и экспериментальная группа: 10 животных с тяжелой ЧМТ. Тяжелую ЧМТ моделировали, как уже указывали в разделе 2, с использованием пружинного ударника по методике О.В. Копьева [16]. Об уровне апоптоза нейронов в очаге повреждения и отдаленных структурах мозга судили по экспрессии гена Вах [15].

Учитывая липидную природу нервной ткани, характеризующуюся

высоким содержанием и разнообразием липидных соединений, в значительной мере определяющих ее морфологическую гетерогенность, метаболизм и функциональную активность, а также то, что фосфолипиды являются одним из наиболее важных компонентов клеточных мембран, вторичных месенджеров и биологически активных соединений, участвующих в механизмах синаптической трансмиссии, мы провели и их исследование. В тканях мозга определяли основные фракции фосфолипидов: фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноамина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, сфингомиелина.

Все показатели в группе животных с тЧМТ определяли через 30 суток после травмы.

На первом этапе исследования мы взвесили левое полушарие головного мозга контрольных животных и животных после тЧМТ. У животных опытной группы через 30 сут после ЧМТ масса травмированного полушария достоверно уменьшалась по сравнению с таковой у интактных животных на 33%, $p < 0,05$ (рис. 3.1).

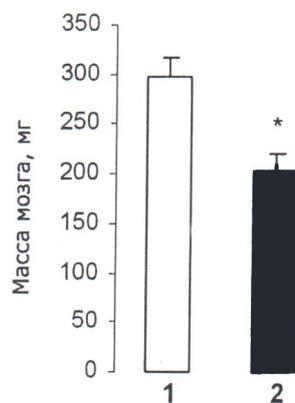


Рис. 3.1. Масса коры левого (травмированного) полушария большого мозга крыс после тЧМТ: 1 – контроль; 2 – тЧМТ, (* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).

Уменьшение массы мозга после травматического повреждения связано с процессами первичной и вторичной альтерации нейронов. Эти результаты согласуются с литературными данными [39, 89].

На втором этапе исследования мы определяли активность апоптического

процесса нейронов и глиальных клеток через 30 сут после тЧМТ. Полученные нами результаты исследования экспрессии гена Вах в коре травмированного полушария мозга свидетельствовали о повышении в 2,3 раза ($p < 0,001$) его уровня по сравнению с таковым у контрольных животных (рис. 3.2).

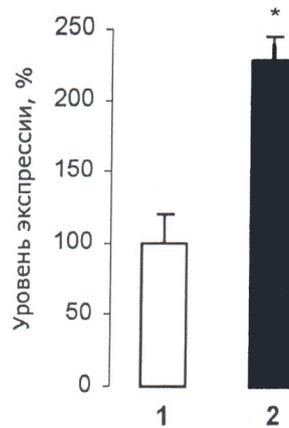


Рис. 3.2. Уровень экспрессии гена Вах в коре левого (травмированного) полушария большого мозга крыс после тЧМТ: 1 – контроль; 2 – тЧМТ, (* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).

На третьем этапе исследования мы изучили соотношение основных фракций фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноамина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, сфингомиелина) в ткани травмированного полушария большого мозга крыс.

Установлено, что через 30 сут после тЧМТ в коре левого полушария головного мозга происходило перераспределение основных фракций фосфолипидов: достоверно снижался уровень фосфатидилхолина на 13% ($p < 0,05$) по сравнению с таковым в контроле, повышался уровень фосфатидилэтаноламина на 22% ($p < 0,05$) (рис. 3.3). Содержание фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола и сфингомиелина изменялось менее значительно. Изменение спектра фосфолипидов приводило к нарушению структурно-функционального состояния биомембран. Перераспределение отдельных фракций фосфолипидов, обеспечивающих избирательную проницаемость и транспортную функцию клеточных мембран, приводило к

нарушению плотности поверхностного заряда мембран и изменению активности некоторых ферментов [31].

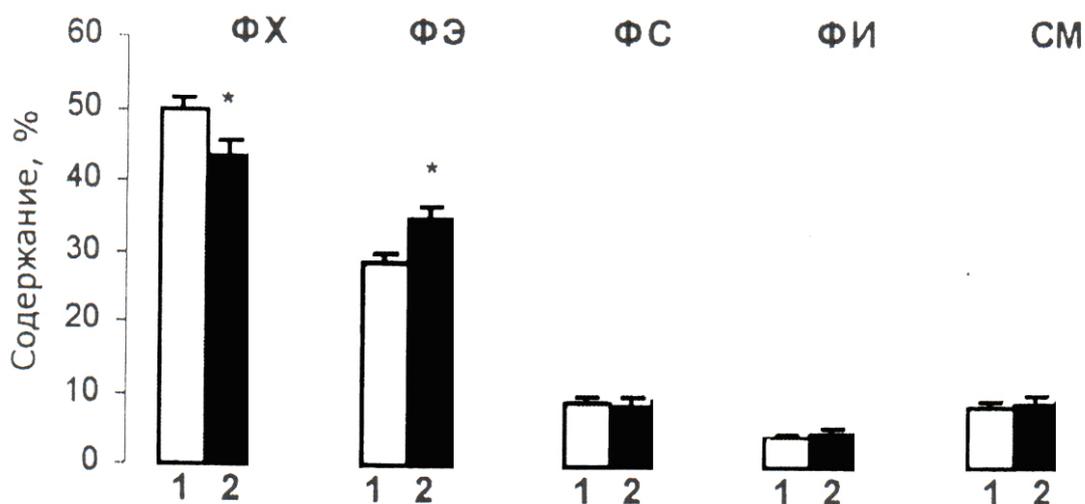


Рис. 3.3. Содержание фракций фосфолипидов (ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозитол, СМ – сфингомиелин) в нервной ткани левого (травмированного) полушария большого мозга крыс после тЧМТ: 1 – контроль; 2 – тЧМТ (* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).

Таким образом, рост величины апоптоза нейронов и нарушение обмена фосфолипидов в коре (травмированного) левого полушария определяют выраженность неврологического дефицита при тЧМТ.

Резюме.

1. Масса травмированного большого мозга экспериментальных животных через 30 сут после тЧМТ по сравнению с контролем уменьшается на 33% ($p < 0,05$).

2. Уровень экспрессии проапоптического гена Вах в коре левого (травмированного) полушария большого мозга крыс через 30 сут после тЧМТ увеличивается в 2,3 раза ($p < 0,001$).

3. После тЧМТ нарушается фосфолипидный состав ткани коры травмированного полушария мозга; в наибольшей степени снижается уровень

фосфатидилхолина (на 13%, $p < 0,05$), а уровень фосфатидилэтаноламина повышался (на 22%, $p < 0,05$).

4. Рост величины апоптоза нейронов и нарушение обмена фосфолипидов в коре (травмированного) левого полушария определяют выраженность неврологического дефицита при тЧМТ.

РАЗДЕЛ IV

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАССТРОЙСТВ НЕЙРОСЕКРЕЦИИ
КАТЕХОЛАМИНОВ, γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И ИХ
МЕТАБОЛИТОВ В КОРЕ И ОТДАЛЕННЫХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО
МОЗГА ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

Глубина и продолжительность расстройств сознания при тяжелой ЧМТ определяется локализацией очагов повреждения в той или иной анатомической структуре мозга (преимущественно коры, подкорковых структур, ствола), каждая из которых осуществляет регуляцию функций мозга посредством определенной нейромедиаторной системы. В основе многих неврологических расстройств сознания при ЧМТ лежит разобщение полушарий большого мозга, ствола и подкорковых структур [22, 40, 60]. В ряде работ доказано наличие выраженной дисфункции различных нейромедиаторных систем мозга при ЧМТ [36, 40, 45]. Важное значение приобретает изучение выраженности и направленности нейротрансмиттерной дисфункции мозга для характеристики неврологических и психических функций, а также оценки эффективности медицинской помощи в динамике ЧМТ.

В настоящем фрагменте работы нами изучено содержание в коре левого (травмированного) и правого полушария, в гиппокампе, стриатуме, среднем мозге, гипоталамусе и продолговатом мозге количества дофамина (ДА), его метаболита гомованилиновой кислоты (ГВК), норадреналина (НА), серотонина (Сер), его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК), гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) для определения патогенетической значимости выявленных изменений.

Исследование выполнено на 20 беспородных половозрелых крысах-самцах 150-180 г, разделённых на две группы. На 10 крысах первой группы моделировали тяжёлую ЧМТ. 10 крыс второй группы служили контролем. Крыс для забора материала забивали методом декапитации под гексеналовым наркозом (забой крыс первой группы происходил на 30-й день после травмы). Из

тканей мозга выделяли левое (травмированное), правое полушарие и диэнцефально-стволовой отдел. Полученный материал хранили в жидком азоте до последующего биохимического анализа. Концентрацию нейромедиаторов определяли с помощью хроматографического анализа и электрохимической детекции (см. раздел 2). Содержание ДА, ГВК и НА в тканях головного мозга в контроле и через 30 суток после тяжелой ЧМТ представлено в таблице 4.1, содержание Сер, 5- ГИУК и ГАМК – в таблице 4.2.

Таблица 4.1

Содержание дофамина, гомованилиновой кислоты и норадреналина в тканях головного мозга крыс в контроле и через 30 дней после тяжелой черепно-мозговой травмы в нг/г ткани ($M \pm m$)

Структура головного мозга	Нейромедиаторы					
	Контроль (n=10)			тЧМТ (n=10)		
	ДА	ГВК	НА	ДА	ГВК	НА
Левое (травмированное) полушарие	867,5±64,5	2045,4±15 6,3	395,7±27,1	768,6±59,4	2408,0±177, 0	172,1±11,3*
Правое полушарие	600,3±40,5	2399,9±16 2,8	245,2±16,4	656,0±38,0	1478,3±107, 8*	463,7±31,2*
Гиппокамп	639,5±51,7	3278,2±21 9,9	547,9±38,1	528,4±49,5	2169,3±197, 6*	456,7±37,1
Стриатум	6150,0±38 9,3	2132,3±13 5,4	5138,2±42 6,8	3843,4±222, 9*	1777,5±107, 4	3729,1±229, 7*
Средний мозг	532,7±49,3	2441,5±19 4,8	661,3±39,7	269,3±11,8*	1937,5±167, 4	744,4±57,3
Гипоталамус	125,9±9,6	1785,4±11 0,5	2302,7±19 2,4	104,5±7,3	1203,2±101, 2*	1644,6±125, 8*
Продолговатый мозг	36,4±2,5	228,1±16,4	733,5±64,2	24,9±1,7*	204,3±16,9	831,9±71,5

* – обозначена достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 4.2

Содержание серотонина, 5-оксииндолуксусной и γ -аминомасляной кислот в тканях головного мозга крыс в контроле и через 30 дней после тяжелой черепно-мозговой травмы в нг/г ткани (M \pm m)

Структура головного мозга	Нейромедиаторы					
	Контроль (n=10)			гЧМТ (n=10)		
	Сер	5-ОИУК	ГАМК	Сер	5-ГИУК	ГАМК
Левое (травмированное) полушарие	74,3 \pm 4,2	204,1 \pm 18,1	2,4 \pm 0,3	37,0 \pm 2,0*	136,0 \pm 10,0*	2,7 \pm 0,1
Правое полушарие	46,6 \pm 2,1	124,2 \pm 11,7	3,1 \pm 0,2	21,5 \pm 1,7*	143,5 \pm 9,8	4,2 \pm 0,3*
Гиппокамп	17,4 \pm 1,2	29,9 \pm 1,8	2,3 \pm 0,11	21,5 \pm 1,7	26,7 \pm 1,4	4,5 \pm 0,3*
Стриатум	27,8 \pm 1,9	204,7 \pm 10,7	2,0 \pm 0,1	5,6 \pm 0,4*	136,7 \pm 11,2*	4,8 \pm 0,2*
Средний мозг	73,8 \pm 5,2	87,3 \pm 4,6	2,6 \pm 0,2	55,2 \pm 3,1*	112,4 \pm 8,7*	5,1 \pm 0,3*
Гипоталамус	75,9 \pm 6,6	111,5 \pm 10,2	2,4 \pm 0,2	27,9 \pm 1,7*	175,3 \pm 9,2*	5,8 \pm 0,4*
Продолговатый мозг	115,4 \pm 8,6	126,3 \pm 9,7	2,2 \pm 0,2	31,2 \pm 2,3*	59,8 \pm 4,6*	3,9 \pm 0,3*

* – обозначена достоверность различий по сравнению с контролем

($p < 0.05$).

В более наглядной форме результаты исследования представлены на рисунках 4.1-4.7.

Как видно из представленных данных, при тяжелой ЧМТ содержание ДА и ГВК в левом (травмированном) полушарии имело тенденцию к снижению, но достоверно на 36,5% ($p < 0,05$) снижалась только концентрация НА (рис. 4.1).

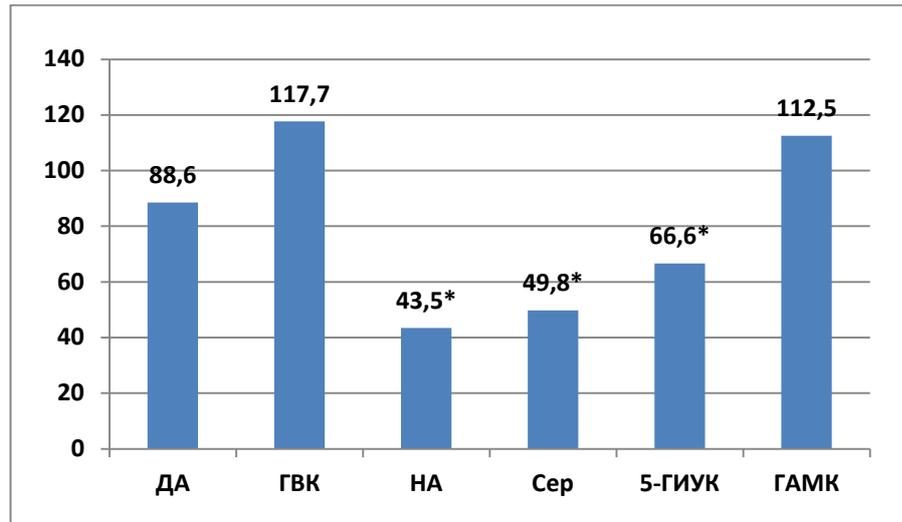


Рис. 4.1. Содержание нейромедиаторов в нейроаминергической системе коры левого (травмированного) полушария головного мозга после тЧМТ (в %). * – обозначена достоверность различий по сравнению с данными контроля ($p < 0,05$), контроль – 100%.

Количество нейромедиаторов ДА и ГВК в правом полушарии после травмы не изменялось, а величина НА увеличивалась на 89,1% ($p < 0,05$) (рис. 4.2). Полученные результаты свидетельствуют, что через 30 дней после ЧМТ уровень нейромедиаторов ДА и его метаболита ГВК в коре левого полушария восстанавливается, а НА нет. В правом полушарии появляется дефицит ГВК и гиперпродукция НА. В целом, между полушариями выявляется нейросекреторная асимметрия. Такие отношения между нейромедиаторами полушарий мозга, наряду со снижением уровня ДА и ГВК, проявляются акинетико-ригидными синдромами [45, 60], а при более выраженном дефиците ДА – эпилептоидным синдромом [1, 17].

Уровень Сер и 5-ГИУК в левом (травмированном) полушарии на 30-й день после тяжелой ЧМТ снижался на 50,2% ($p < 0,05$) и на 33,4 % ($p < 0,05$) соответственно, а ГАМК'а не изменялся (рис. 4.1). В правом полушарии (рис. 3.2) уровень Сер также снижался на 53,9 % ($p < 0,05$).

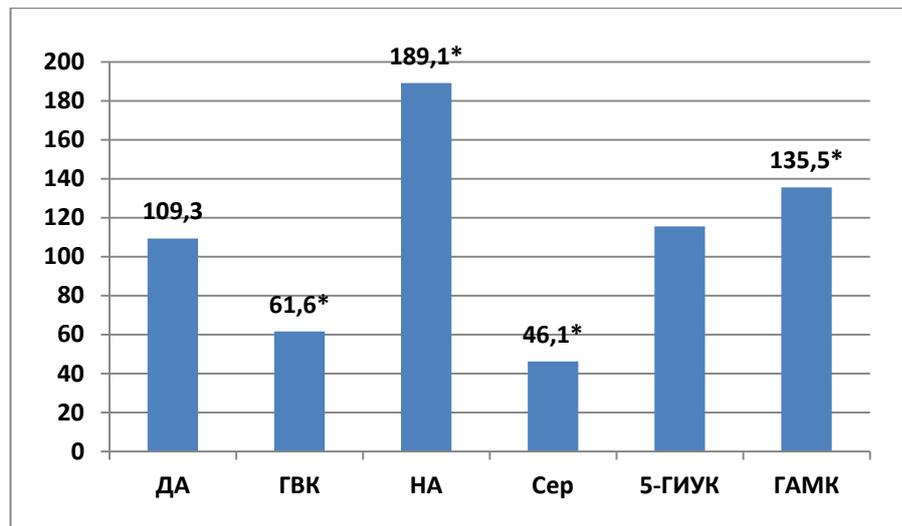


Рис. 4.2. Содержание нейромедиаторов в нейроаминергической системе коры правого полушария головного мозга после тЧМТ.

* – обозначена достоверность различий по сравнению с данными контроля ($p < 0,05$), контроль – 100%.

Количество предшественника серотонина 5-ГИУК не изменялось. Величина содержания ГАМК в правом полушарии, наоборот, увеличивалась на 35,5% ($p < 0,05$). Снижение уровня серотонина в тканях коры головного мозга свидетельствовало о нарушении в работе стресс-лимитирующей системы мозга [1, 19, 52]. Снижение активности серотонинергической системы также нарушало взаимодействие между нейроэндокринной и иммунной системами [17, 83]. Известно, что коммуникация между иммунной и нервной системами осуществляется благодаря тому, что рецепторы цитокинов имеются в ЦНС; в свою очередь, рецепторы для нейромедиаторов – в лимфоидной ткани [36, 83]. Благодаря серотонину при ЧМТ в патологический процесс вовлекается иммунная система организма, хотя патогенетическая роль серотонина в выраженности иммунологических нарушений остается до конца не выясненной [22, 36]. Увеличение количества ГАМК в правом полушарии связано с компенсаторной ролью ГАМК-ергической системы, которая тормозит нейрональную активность возбуждающих нейромедиаторов [5, 40, 83]. Активация ГАМК-ергических и глициновых рецепторов приводит к открытию ионных хлорных каналов, что позволяет ионам Cl^{-} проникать в нейрон, вызывая

его гиперполяризацию. В результате этого нейроны становятся менее чувствительными к стимулам. В настоящее время уточняется роль ГАМК-ергических механизмов в повышении устойчивости организма к ЧМТ[41, 91].

В гиппокампе (рис. 4.3) величина ГВК после тяжелой ЧМТ снижалась на 33,8% ($p<0,05$), а ГАМК, наоборот, повышалась на 95,7% ($p<0,05$).

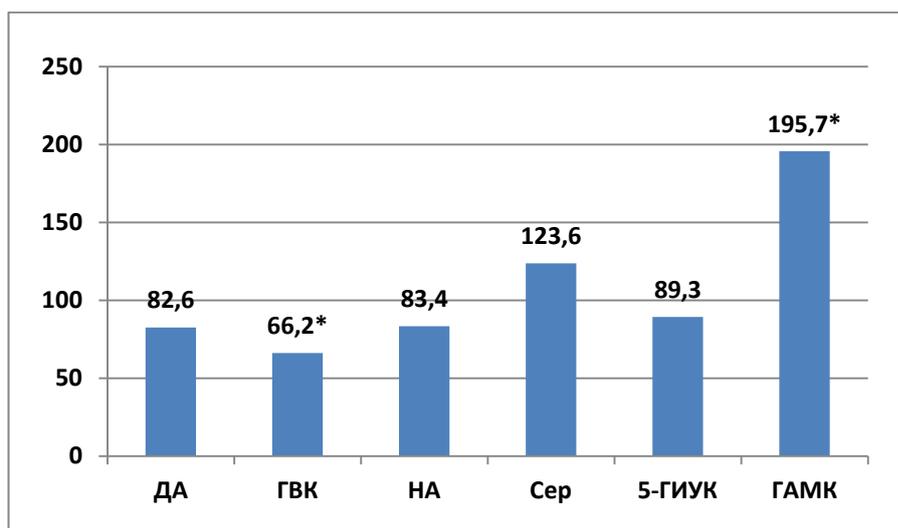


Рис. 4.3. Содержание нейромедиаторов в нейроаминергической системе гиппокампа головного мозга после тЧМТ.

* – обозначена достоверность различий по сравнению с данными контроля ($p<0,05$), контроль – 100%.

В стриатуме (рис. 4.4) уровень ДА был снижен на 37,5% ($p<0,05$), НА - на 27,4 % ($p<0,05$), Сер - на 78,9% ($p<0,05$), 5-ГИУК – на 33,2% ($p<0,05$), а вот количество ГАМК увеличивалось в 2,4 раза($p<0,05$).

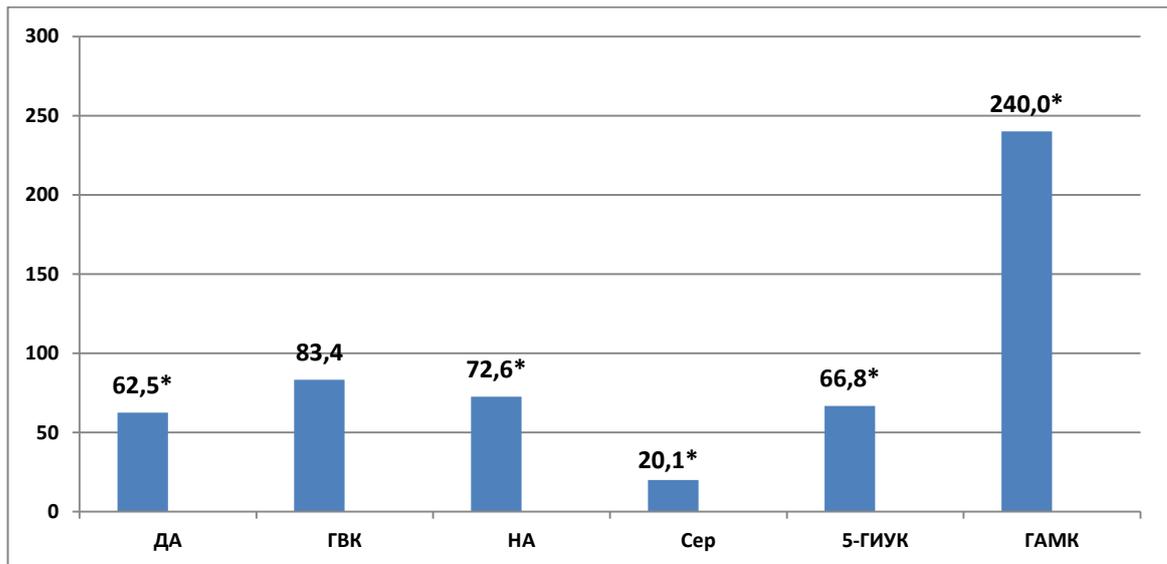


Рис. 4.4. Содержание нейромедиаторов в нейроаминергической системе стриатума головного мозга после тЧМТ.

* – обозначена достоверность различий по сравнению с данными контроля ($p < 0,05$), контроль – 100%.

Уменьшение количества катехоламинов в отдаленных от зоны повреждения нейронах гиппокампа и стриатуме свидетельствует о выпадении из интегративной деятельности мозга этих структур и некоторых важных функций организма. Гиппокамп входит в состав лимбической системы мозга. Повреждения в этой системе могут провоцировать повышение судорожной готовности и возникновение судорог. После черепно-мозговой травмы часто наблюдается развитие эпилептиморфных состояний лимбического генеза [1, 19, 91]. В наших исследованиях их вероятность подтверждается низким содержанием катехоламинов в гиппокампе. За противодействие судорожной активности указывают высокие значения ГАМК.

В среднем мозге уровень ДА после тяжелой ЧМТ снижался на 49,4% ($p < 0,05$), ГВК в гипоталамусе – на 32,6% ($p < 0,05$), а НА – на 28,6% ($p < 0,05$) (рис. 4.5, рис. 4.6).

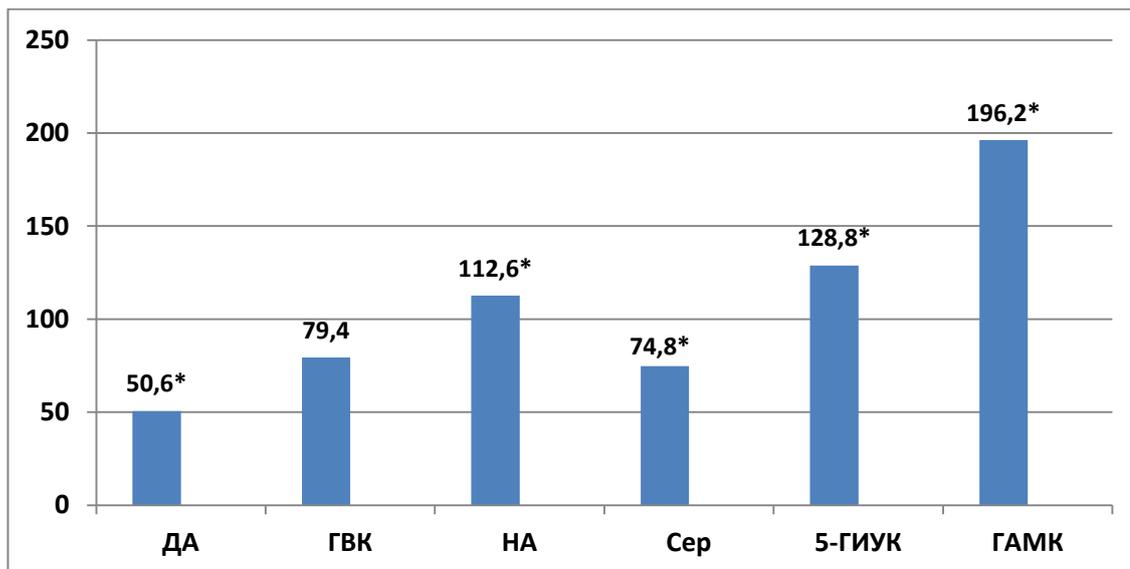


Рис. 4.5. Содержание нейромедиаторов в нейроаминергической системе среднего мозга после тЧМТ.

* – обозначена достоверность различий по сравнению с данными контроля ($p < 0,05$), контроль – 100%.

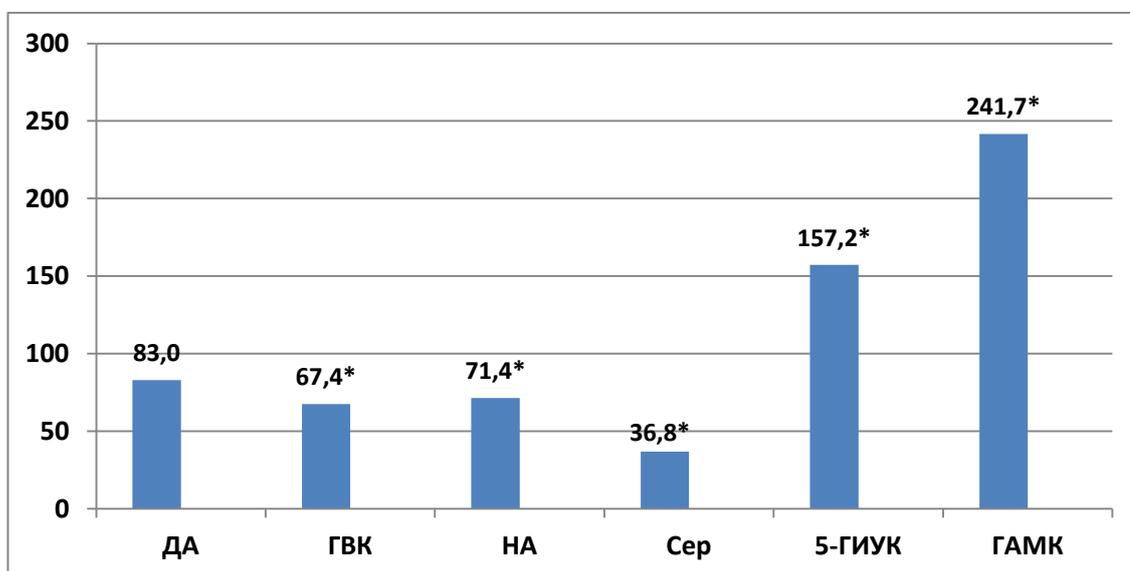


Рис. 4.6. Содержание нейромедиаторов в нейроаминергической системе гипоталамуса после тЧМТ.

* – обозначена достоверность различий по сравнению с данными контроля ($p < 0,05$), контроль – 100%.

В среднем мозге и гипоталамусе также было снижено на 25,2% ($p<0,05$) и 63,2% ($p<0,05$) содержания серотонина, а вот количество 5-ГИУК и ГАМК, наоборот, увеличивалось. Количество 5-ГИУК в среднем мозге возрастало на 28,8% ($p<0,05$), а в гипоталамусе на 57,2% ($p<0,05$). Количество ГАМК соответственно увеличивалось на 96,2% ($p<0,05$) и в 2.4 раза ($p<0,05$). Учитывая, что средний мозг отвечает за нормальное функционирование центров слуха и зрения, формирование мимики, то изменения в содержании нейромедиаторов, могли указывать в пользу их нарушений [19, 22, 91]. Влияние гипоталамуса на внутренние органы и системы с помощью ЦНС и желез внутренней секреции при выявленных нами нарушениях нейросекреции указывало на возможность расстройств терморегуляции, ритма сердечной деятельности, дыхания, артериального давления, кишечной перистальтики и других функций [5, 83].

В продолговатом мозге (рис.4.7) содержание дофамина после тяжелой ЧМТ снижалось на 83% ($p<0,05$), серотонина - на 83,0 % ($p<0,05$), 5-ГИУК – на 52.7% ($p<0,05$), а ГАМК, наоборот, увеличилось на 77,3% ($p<0,05$).

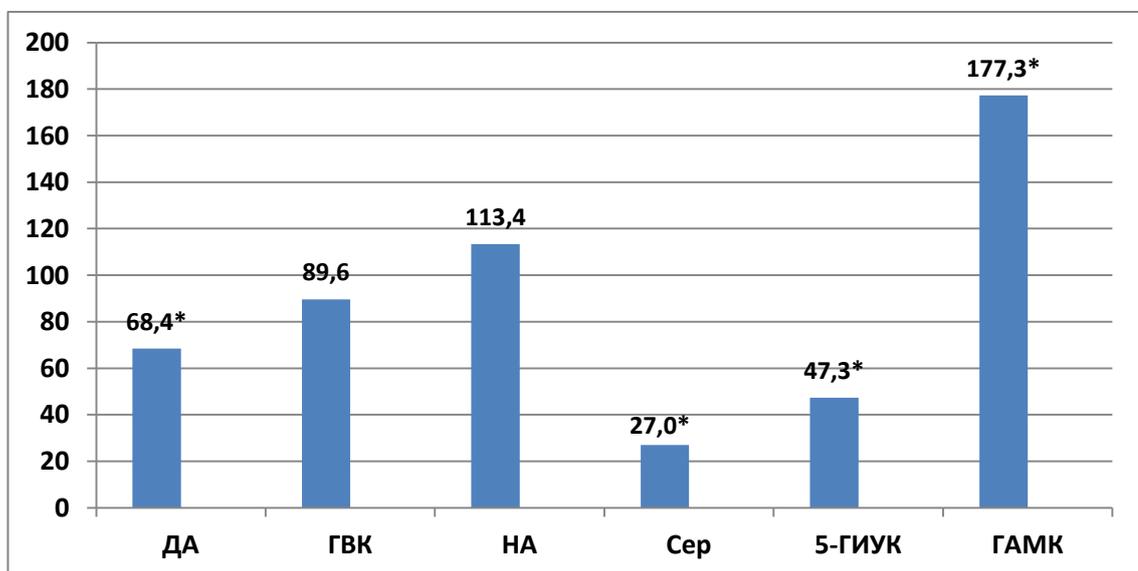


Рис. 4.7. Содержание нейромедиаторов в нейроаминергической системе продолговатого мозга после тЧМТ.

* – обозначена достоверность различий по сравнению с данными контроля ($p<0,05$), контроль – 100%.

Снижение в продолговатом мозге концентрации катехоламинов указывало на возможные нарушения таких его функций, как кровообращение, дыхание, пищеварение, координация тела [17, 83]. Активация ГАМК–ергической системы могла снижать проявления описанных нарушений.

По выраженности изменений нейромедиаторов наиболее чувствительными к повреждению структурами головного мозга являются стриатум и гипоталамус.

Исходя из морфометрических характеристик моноаминергической системы мозга, можно заключить, что моноаминергические нейроны являются факторами интегративной деятельности. Они участвуют в обработке сигналов внутренней и внешней среды организма и в дальнейшем осуществляют активирующее или тормозное влияние на структуры промежуточного и переднего мозга [19, 22, 51]. Тела значительной части этих нейронов образуют мощную восходящую систему, которая начинается в области продолговатого мозга, моста, промежуточного мозга и заканчивается на телах нейронов коры и других отделов головного мозга. Норадреналин, дофамин и серотонин возбуждает, а γ -аминомасляная кислота – тормозит активность центральной нервной системы. При этом часть афферентных связей моноаминоергических систем заканчивается на ГАМК–ергических нейронах, которые дальше передают тормозной потенциал. Для функционирования ЦНС важен баланс тормозных и возбуждающих нейромедиаторов. Многие авторы научных исследований указывают, что рост содержания дофамина в мозге крыс может является неблагоприятным фактором, с которым связана повышенная судорожная готовность [5, 22, 51]. Есть, также, свидетельство о прямой корреляции между выраженной межполушарной асимметрией в уровне норадреналина и судорожной готовности [41, 60]. Наши результаты исследования по изучению содержания нейромедиаторов в коре больших полушарий и отдаленных структур головного мозга позволяют сделать заключение, что в посттравматическом периоде у животных формируется новое функциональное состояние, характерное для мозга с повышенной судорожной готовностью.

Полученные нами данные дают основание для дальнейшего использования показателей моноаминергической системы мозга при тяжелой ЧМТ в качестве критериев эффективности проводимой экспериментальной фармакотерапии и трансплантации фетальной нервной ткани.

Резюме:

1. Через 30 дней после ЧМТ в коре левого (травмированного) полушария, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и продолговатом мозге имеет место снижение содержания нейромедиаторов.

2. По выраженности изменений нейромедиаторов наиболее чувствительными к повреждению структурами головного мозга являются стриатум и гипоталамус.

3. В контрлатеральном (правом) полушарии головного мозга после тяжелой ЧМТ имеет место компенсаторное повышение норадреналина и ГАМК.

4. Показатели моноаминергической системы мозга при тяжелой ЧМТ целесообразно использовать в качестве критериев эффективности проводимой экспериментальной фармакотерапии и трансплантации фетальной нервной ткани.

РАЗДЕЛ V

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФЕТАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ВЫРАЖЕННОСТЬ АПОПТОЗА И СОСТАВ ФОСФОЛИПИДОВ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

В третьем разделе нами было показано, что масса травмированного большого мозга экспериментальных животных через 30 сут после тЧМТ по сравнению с контролем уменьшается на 33% ($p < 0,05$). При этом уровень экспрессии проапоптического гена *Bax* в коре левого (травмированного) полушария большого мозга крыс увеличивается в 2,3 раза ($p < 0,001$) и нарушается фосфолипидный состав ткани коры травмированного полушария мозга; в наибольшей степени снижается уровень фосфатидилхолина (на 13%, $p < 0,05$), а уровень фосфатидилэтаноламина повышался (на 22%, $p < 0,05$). Эти данные свидетельствовали, что высокая величина апоптоза нейронов и нарушение обмена фосфолипидов в коре (травмированного) левого полушария определяли выраженность неврологического дефицита при тЧМТ. Влияние на анатомическую реконструкцию поврежденной ткани фетальной нервной ткани при ЧМТ изучено недостаточно.

В патогенезе тЧМТ важное значение имеют нарушения, возникающие в месте механического размозжения ткани, поэтому наше исследование посвящено изучению основных показателей деструктивных процессов именно в травмированном (левом) полушарии большого мозга экспериментальных животных при тЧМТ, а также влиянию на эти показатели ФНТ.

В настоящем фрагменте работы мы изучили влияние трансплантации фетальной нервной ткани на вес коры травмированного полушария большого мозга, апоптоз и липидный ее состав через 1 мес после нанесения экспериментальной ЧМТ.

В исследовании использовали самцов 10 беспородных половозрелых крыс массой тела 180-220 г, а также 10 беременных самок с 18-дневными эмбрионами. Трансплантацию ФНТ проводили через 2 часа после травмы. Операцию

выполняли под нембуталовым наркозом - 4 мг/ 100г живого веса. Для трансплантации использовали гомологичные участки сенсомоторной коры 18-дневных эмбрионов крыс. Ткань выделяли и хранили в стерильных условиях не более 40 мин в среде 199. Перед трансплантацией удаляли тканевой детрит, образовавшийся в травмированном участке. В образовавшуюся полость после хирургической обработки вводили 2 мм³ фетальной нервной ткани. Животных экспериментальной группы декапитировали через 30 сут после травмы и трансплантации одновременно с животными контрольной группы.

Исследования массы левого полушария животных после тЧМТ и трансплантации ФНТ показали, что вес левого полушария мозга увеличился на 50 мг ($p < 0,05$), хотя уровня контрольных значений он не достиг (см. рис. 5.1).

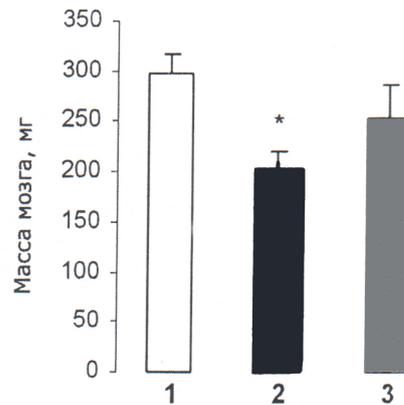


Рис. 5.1. Масса коры левого (травмированного) полушария большого мозга крыс после тЧМТ и ТФНТ: 1 – контроль; 2 – тЧМТ; 3 – тЧМТ и ТФНТ, (* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).

Увеличение массы травмированного отдела мозга после трансплантации ФНТ свидетельствует о приживлении трансплантата ФНТ.

Изучение процесса апоптоза нейронов и глиальных клеток посредством определения экспрессии гена Вах, являющегося показателем активности апоптических процессов, свидетельствовали о положительном влиянии трансплантации ФНТ на этот показатель. У животных, которым после тЧМТ произведена трансплантация ФНТ, в коре левого (травмированного) полушария отмечено замедление активности процессов апоптоза (рис. 5.2). По сравнению с

уровнем экспрессии Вах животных с травмой без трансплантации оно уменьшилось на 70% ($p < 0,05$).

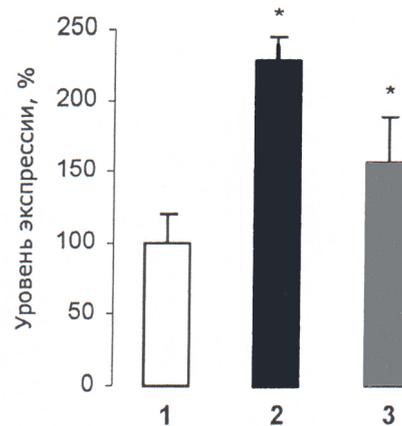


Рис. 5.2. Уровень экспрессии гена Вах в коре левого (травмированного) полушария большого мозга крыс после тЧМТ и ТФНТ (* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).

Такое замедление свидетельствует о нормализации (но не полной) уровня экспрессии Вах (апоптоза).

Результаты изучения соотношения основных фракций фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноамина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, сфингомиелина) в ткани травмированного полушария большого мозга крыс после трансплантации ФНТ показаны на рис. 5.3. Как видно из этого рисунка через 30 сут после тЧМТ отмечали перераспределение основных фракций фосфолипидов: достоверное снижение уровня фосфатидилхолина на 13% ($p < 0,05$) по сравнению с таковым в контроле, повышение уровня фосфатидилэтаноамина на 22% ($p < 0,05$). Содержание фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола и сфингомиелина изменялось менее значительно. Вследствие изменения спектра фосфолипидов нарушалось структурно-функциональное состояние биомембран. Перераспределение отдельных фракций фосфолипидов, обеспечивающих избирательную проницаемость и транспортную функцию клеточных мембран, обусловило изменение плотности поверхностного заряда мембран и нарушение активности

некоторых ферментов [26]. Трансплантация ФНТ травмированным животным способствовала сохранению соотношения липидных фракций на уровне контрольных значений.

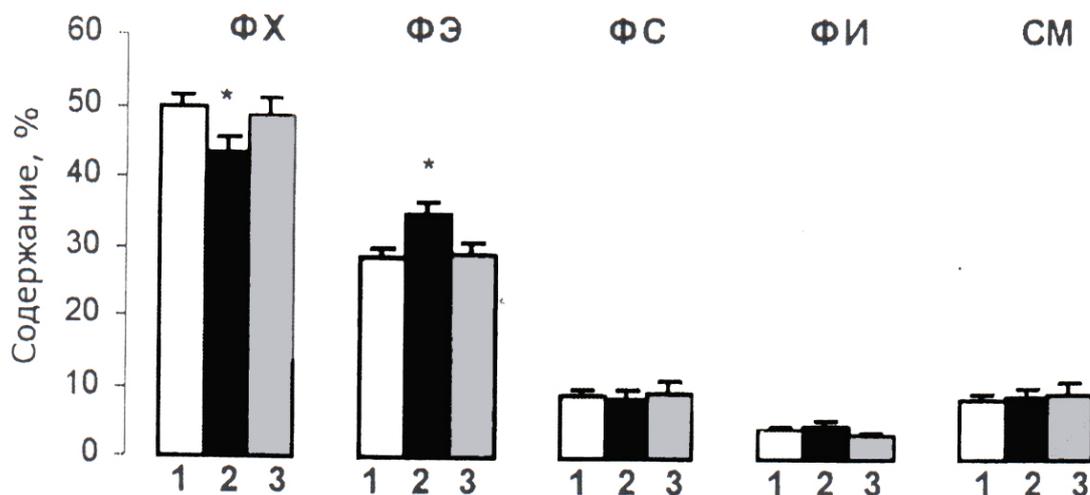


Рис. 5.3. Содержание фракций фосфолипидов

Примечание: ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ - фосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозитол, СМ – сфингомиелин в нервной ткани левого (травмированного) полушария большого мозга крыс после тЧМТ и ТФНТ (* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).

Из полученных данных вытекает, что при тЧМТ трансплантация ФНТ приводит к восстановлению фосфолипидного состава коры травмированного полушария мозга.

Результаты исследования подтверждают данные ряда исследователей относительно положительного влияния трансплантации ФНТ на течение тЧМТ [27-30]. Одним из механизмов такого влияния является опосредованное некоторыми факторами роста фетальной нервной ткани антиапоптотическое воздействие на нейроны поврежденного полушария, а также в связи с этим изменение топологических и функциональных свойств нейрональной сети мозга, то есть активности его медиаторных систем, путем повышения нейрональной пластичности.

Перспективность применения трансплантации ФНТ для лечения

пострадавших при тЧМТ зависит от возможности ее заместительного действия в месте повреждения тканей, а также регуляторного и трофического влияния на функционирование всего мозга. Вопрос приживления трансплантата ФНТ тщательно изучен в работах [24]. Результаты наших исследований свидетельствовали о восстановлении архитектоники нервной ткани в коре большого мозга травмированных животных.

Резюме.

Трансплантация аллогенной фетальной нервной ткани способствует:

- а) сохранению массы травмированного полушария на контрольном уровне;
- б) нормализации (но не полной) уровня экспрессии Вах;
- в) восстановлению фосфолипидного состава ткани коры травмированного полушария мозга.

РАЗДЕЛ VI

**ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФЕТАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ НА
ОБМЕН КАТЕХОЛАМИНОВ В ТРАВМИРОВАННОМ
ПОЛУШАРИИ И ОТДАЛЕННЫХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО
МОЗГА ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

Несмотря на имеющиеся успехи в современной травматологии и нейрохирургии восстановление функций головного мозга после тЧМТ составляет сложную медицинскую проблему. В практическом здравоохранении отсутствует эффективная фармакотерапия, а стандартизованные варианты лечения этой патологии разработаны недостаточно [9].

В последнее время появилась возможность для восстановления функции травмированного головного мозга применять стволовые клетки, которые обладают нейропротекторным и нейрорегенеративными свойствами [2, 4]. В патогенетическом плане вопросы влияния фетальной нервной и мышечной ткани на нейромедиаторный обмен в головном мозге изучены недостаточно, как и сроки оптимальной трансплантации стволовых клеток.

В настоящем фрагменте работы нами изучено содержание нейромедиаторов дофамина и норадреналина в диэнцефально-стволовом отделе и коре головного мозга после трансплантации фетальной нервной и мышечной ткани в раннем и позднем периоде тяжелой черепно-мозговой травмы.

Исследования выполнены на 56 беспородных половозрелых крысах весом 180-220 г. ТЧМТ у 46 крыс моделировали путем нанесения по черепу удара стандартной силы по области черепа с повреждением левой доли коры головного мозга. Фетальную нервную ткань (ФНТ) получали из мозга 18-ти дневных эмбрионов крыс. Для трансплантации применяли 2 мм³ фетальной нервной ткани из сенсомоторной области коры мозга. В первой группе (n=12) использовали цельную ткань головного мозга, во второй 2 мм³ суспензии клеток из сенсомоторной области коры мозга (n=12). В третьей группе в качестве контроля в область травмированного мозга вводили 2 мм³ фетальной мышечной ткани

взятой из бедра крысят ($n=12$). Каждая группа была поровну разделена на две подгруппы. В первой подгруппе трансплантацию фетальных клеток проводили через 2 часа после моделирования тЧМТ, во второй подгруппе – через 5 суток. 10 крыс составляли группу сравнения (моделирование ЧМТ) и 10 крыс – контрольную группу.

Всех травмированных животных под гексеналовым наркозом декапитировали через 30 суток после тЧМТ. Из тканей головного мозга выделяли левое (травмированное), правое полушарие и диэнцефально-стволовой отдел. Полученный материал помещали в жидкий азот для хранения и последующего биохимического анализа. Концентрацию дофамина и норадреналина в нервной ткани головного мозга крыс определяли с помощью хроматографического анализа и электрохимической детекции [23].

На первом этапе исследования изучали содержание нейромедиаторов (дофамина и норадреналина) в коре левого полушария (ЛП), правого полушария (ПП) и диэнцефально-стволовом отделе (ДСО) мозга через 30 дней после ЧМТ в сравниваемой группе и в группах после введения фетальных клеток в раннем периоде ЧМТ. Результаты исследования представлены в таблице 6.1, рис. 6.1 – 6.4.

Таблица 6.1

Содержание нейромедиаторов в коре и диэнцефально-стволовом отделе головного мозга в сравниваемой группе и после введения фетальной ткани в область поврежденного мозга в раннем периоде ЧМТ ($M \pm D$ в %) от уровня контроля.

Наименование серии опытов	Содержание нейромедиаторов					
	Дофамин			Норадреналин		
	ЛП	ПП	ДСО	ЛП	ПП	ДСО
1. тЧМТ (сравниваемая группа)	77±8*	108±10	77±5*	86±14*	131±13*	104±8
2. тЧМТ + суспензия ФНТ	115±27	165±19*	85±8	76±12*	108±23	93±3
3. тЧМТ + гомологичный участок ФНТ	110±11	120±14	107±8	106±8	153±4*	91±12
4. тЧМТ + ФМТ	52±14*	109±15	93±3	71±7*	122±13	98±3

Примечание: * – обозначена достоверность различий по сравнению с данными интактных животных ($p < 0,05$).

Из этой таблицы видно, что при тЧМТ (в сравниваемой группе) содержание дофамина в коре левого (травмированного) полушария мозга относительно уровня интактных животных снижалось на 23% ($p < 0,05$), а норадреналина на 14% (рис. 6.1.).

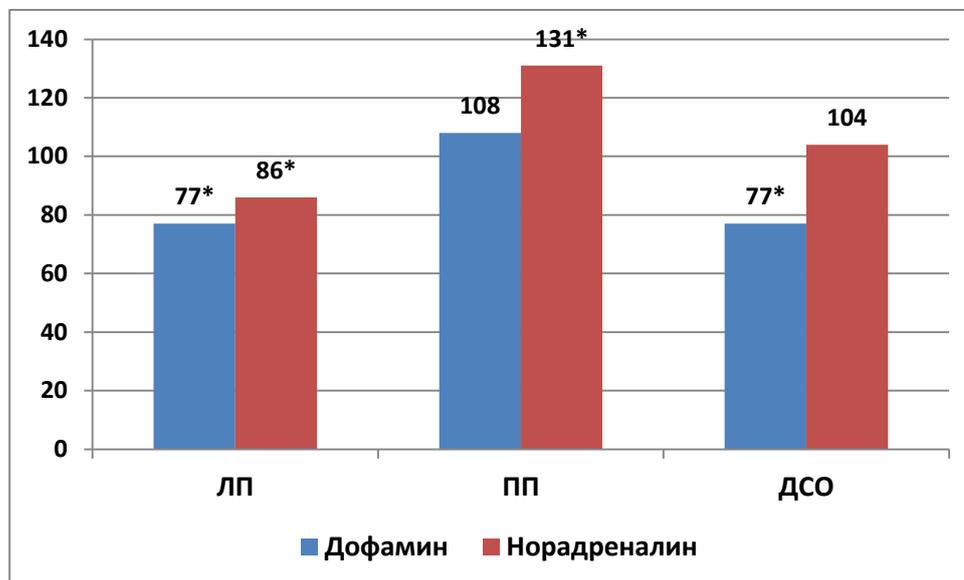


Рис. 6.1. Содержание нейромедиаторов в коре головного мозга и диэнцефально-стволовом отделе в сравниваемой группе в раннем периоде ЧМТ (в % от уровня контроля). Примечание: – ЛП – левое полушарие, ПП – правое полушарие, ДСО – диэнцефально-стволовой отдел.

Введение суспензии ФНТ и гомологичного участка этой ФНТ восстанавливало уровень дофамина в коре левого полушария мозга (рис. 6.2.). Между тем, вводимая суспензия количество норадреналина не увеличивала (он оставался на 24% меньше, чем у интактных крыс), а введение в область травмированного мозга гомологичного участка ФНТ – уровень норадреналина восстановило ($p < 0,05$). Введение животным с ЧМТ суспензии фетальных мышечных клеток не способствовало восстановлению в коре величины обеих нейромедиаторов.

Содержание дофамина в коре правого полушария мозга после ЧМТ в сравниваемой группе не изменялось, а норадреналина увеличивалось на 31% ($p < 0,05$).

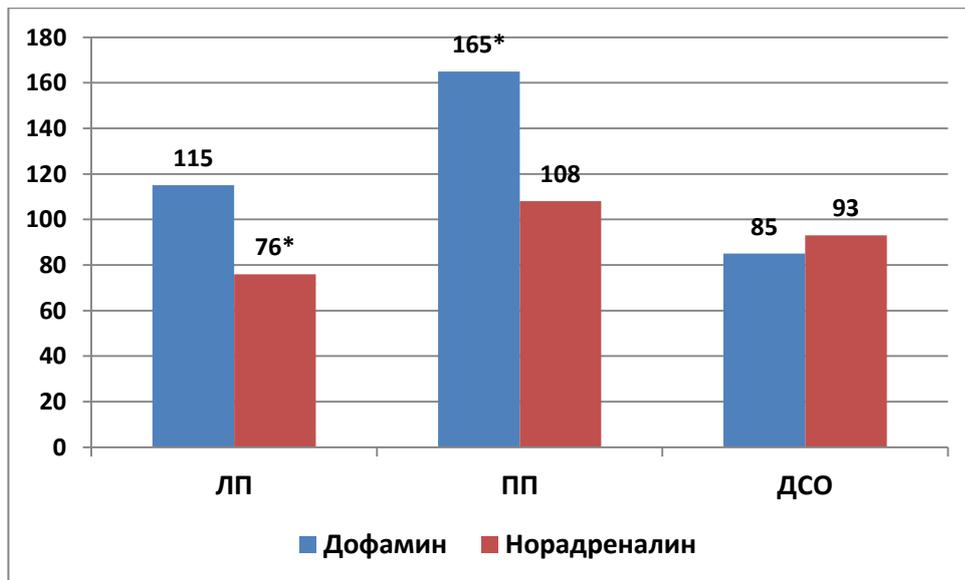


Рис. 6.2. Содержание нейромедиаторов в коре головного мозга и диэнцефально-стволовом отделе при тЧМТ + суспензия ФНТ в раннем периоде ЧМТ (в % от уровня контроля). Примечание: см. рис. 6.1.

Введение суспензии ФНТ повышало содержание дофамина на 65% ($p < 0,05$), а уровень норадреналина не изменялся. После введения гомологичного участка ФНТ содержание дофамина не увеличивалось, а норадреналина повышалось на 53% ($p < 0,05$). Введение фетальной мышечной ткани уровень нейромедиаторов не изменяло.

Содержание дофамина в диэнцефально-стволовом отделе после ЧМТ в сравниваемой группе было на 23% ($p < 0,05$) меньше, чем у интактных животных, а уровень норадреналина был как у интактных животных. Введение суспензии фетальной нервной ткани значения исследованных нейромедиаторов не увеличило. Использование с лечебной целью гомологичного участка ФНК нормализовало величину нейромедиаторов. Применение фетальных мышечных клеток оставило значения дофамина и норадреналина в прежних пределах.

Из приведенных результатов исследования следовало, что при тяжелой ЧМТ имеет место глубокое нарушение содержания нейромедиаторов в коре головного мозга, причем больше в травмированном левом полушарии. Содержание дофамина и норадреналина в диэнцефально-стволовом отделе головного мозга не изменялось. Уровень медиаторных нарушений фетальной мышечной тканью

не корректируется. Только введение в зону поражения мозга суспензии или гомологичного участка фетальной нервной ткани позволяет восстанавливать содержание нейромедиаторов в левом и правом полушарии головного мозга. Наиболее эффективное восстановление этих показателей наблюдалось после применения гомологичных участков ФНТ (рис. 6.3.).

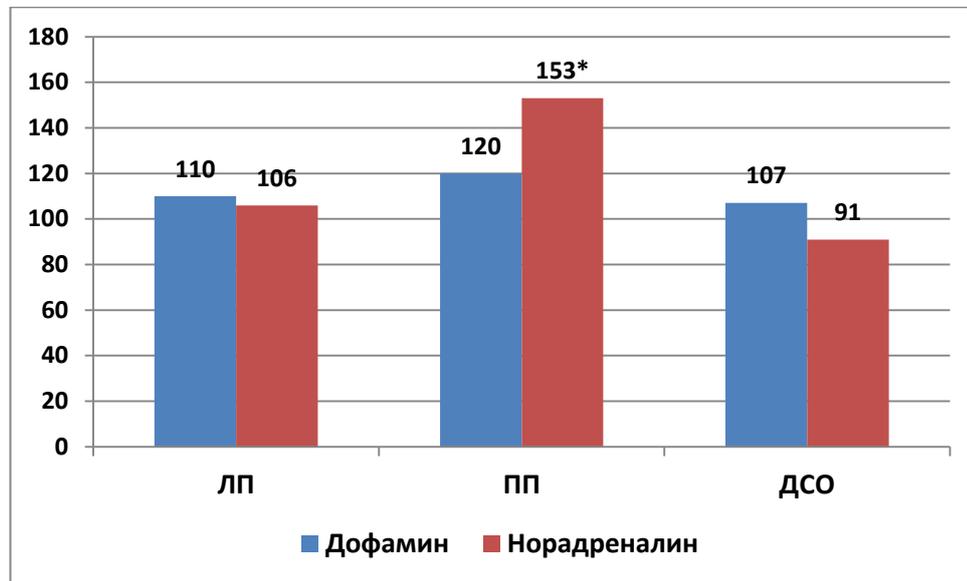


Рис. 6.3. Содержание нейромедиаторов в коре головного мозга и диэнцефально-стволовом отделе при тЧМТ + гомологичный участок ФНТ в раннем периоде ЧМТ (в % от уровня контроля). Примечание: см. рис. 6.1.

Большая эффективность гомологичных участков ФНТ по сравнению с суспензией ткани указывает на то, что трансплантированная ФНТ устанавливает контакты с клетками хозяина. Возможность установления синаптических связей в процессе трансплантации ФНТ обусловлено идентичностью контактов между клетками мишенями и интактными клетками ФНТ [80, 137]. Процесс приживания ФНТ существенно тормозится, если в зоне поврежденной нервной ткани имеют место глубокие нарушения микроциркуляции и обмена, в частности, при усилении перекисного окисления липидов. Введение в такое клеточное окружение фрагментов ФНТ подвергается апоптозу и некрозу [4].

Имеются сообщения, что применение средств, которые снижают апоптоз и некроз, улучшает приживание трансплантата и его интеграцию с тканью хозяина [9]. Хорошие результаты получены при ингибировании протеолиза и

перекисления липидов. Показано, что для предотвращения деструктивных процессов прибегают к обработке имплантата трофическими факторами (BDGF, GDFG) [9, 80], или введению антител к миелинзависимому ингибитору роста нейронов [2, 137].

Получены данные, которые объясняют, что после трансплантации ФНТ и ее приживлении происходит блокада ретроградной дегенерации дофаминергических волокон и стимулирование функционирования тел нейронов среднего мозга, что способствует поддержанию уровня катехоламинов как у интактных животных [3, 66].

Содержание нейромедиаторов (дофамина и норадреналина) в коре ЛП, ПП и ДСО через 30 дней после ЧМТ в сравниваемой группе и в группах после введения фетальных клеток в позднем периоде ЧМТ (через 5 суток после травмы) представлено в таблице 6.2 и рис. 6.5–6.7.

Таблица 6.2

Содержание нейромедиаторов в коре и диэнцефально-стволовом отделе головного мозга в сравниваемой группе и после введения фетальной ткани в область поврежденного мозга в позднем периоде ЧМТ ($M \pm D$ в %) от уровня контроля.

Наименование серии опытов	Содержание нейромедиаторов					
	Дофамин			Норадреналин		
	ЛП	ПП	ДСО	ЛП	ПП	ДСО
1. тЧМТ (сравниваемая группа)	77±8	108±10	77±5	86±14	131±13	104±8
2. тЧМТ + суспензия ФНТ	60±12	105±11	115±5	82±10	110±10	105±8
3. тЧМТ + гомологичный участок ФНТ	65±13*	120±14	204±7*	95±3	153±4*	115±6
4. тЧМТ + ФМТ	70±10*	105±18	85±10	85±13	115±14	108±7

Примечание: см. табл. 6.1.

Из этой таблицы видно, что ни суспензия ФНТ, ни ФМТ не восстанавливали сниженный уровень дофамина и норадреналина в ЛП (травмированном) (рис. 6.5 и 6.7.).

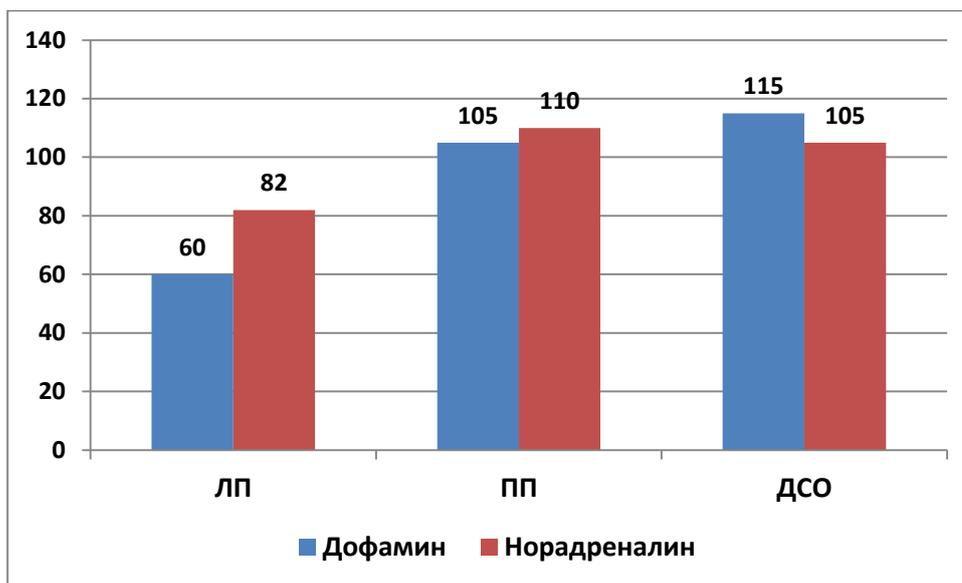


Рис. 6.5. Содержание нейромедиаторов в коре головного мозга и диэнцефально-стволовом отделе при тЧМТ + суспензия ФНТ в позднем периоде ЧМТ (в % от уровня контроля). Примечание: см. рис. 6.1.

Суспензия ФНТ и ФМТ не изменяли значения нейромедиаторов в ПП и ДСО.

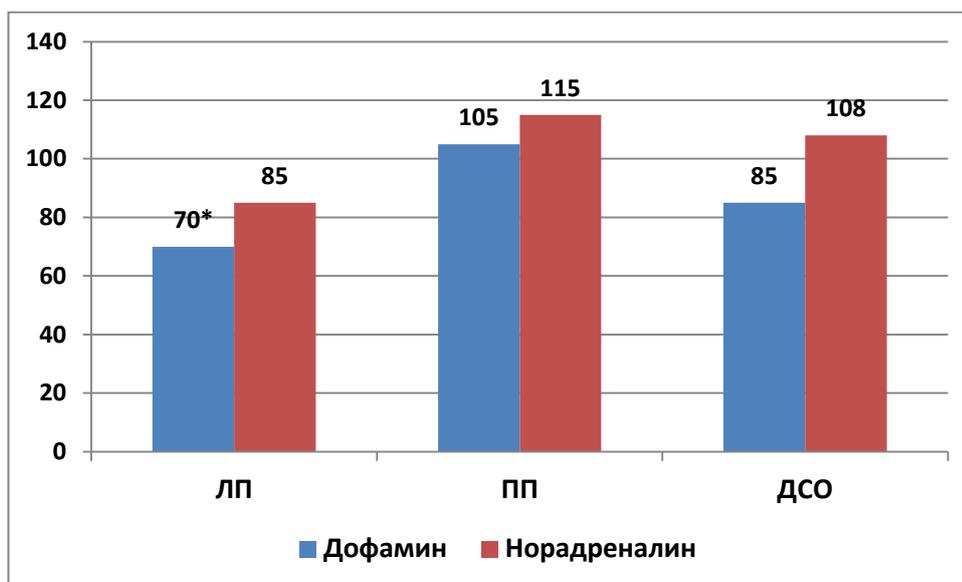


Рис. 6.7. Содержание нейромедиаторов в коре головного мозга и диэнцефально-стволовом отделе при тЧМТ + ФМТ в позднем периоде ЧМТ (в % от уровня контроля). Примечание: см. рис. 6.1.

Пересадка гомологичного участка ФНТ в позднем периоде ЧМТ также не изменяла уровень дофамина в левом и правом полушариях, но увеличивала этот уровень в ДСО в 2,0 раза ($p < 0,05$) (рис.6.6.).

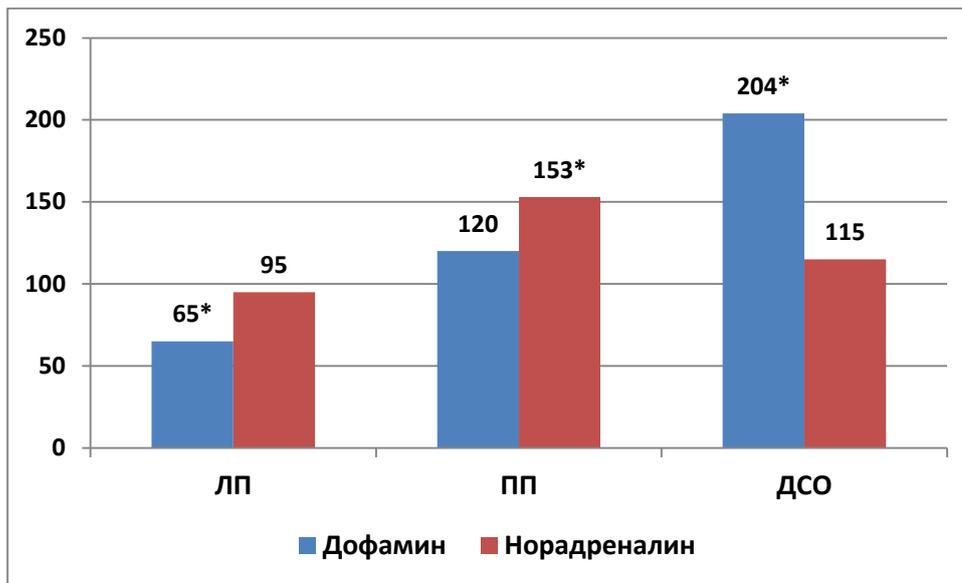


Рис. 6.6. Содержание нейромедиаторов в коре головного мозга и диэнцефально-стволовом отделе при тЧМТ + гомологичный участок ФНТ в позднем периоде ЧМТ (в % от уровня контроля). Примечание: см. рис. 6.1.

Величина норадреналина после пересадки в травмированную зону мозга ФНТ в левом полушарии и ДСО не изменялась, но в правом увеличивалась на 53% ($p < 0,05$).

Увеличение показателей дофамина и норадреналина в неповрежденных зонах мозга, вероятно, следует объяснить действием нейротрофических факторов, содержащихся в участке ФНТ. Однако такой стимулирующий эффект оказывался недостаточным для восстановления значений нейромедиаторов в травмированном левом полушарии головного мозга.

Наши исследования подтвердили возможность эффективного применения аллогенного трансплантата в сенсомоторной коре головного мозга экспериментальных животных после тЧМТ. Трансплантат способен

образовывать правильные проекции к своим структурам – мишеням в мозге реципиента. Более того, сам трансплантат в процессе приживания иннервируется клетками хозяина. Однако такая иннервация может происходить лишь на раннем этапе (через 2 часа после травмы) ЧМТ. Замещение потерянных нейронов реципиента имплантатом в функциональном плане успешно возобновляет нейросекрецию моноаминергических нейронов. Наши исследования показали, что ФНТ активно изменяет нейротрансмиттерный метаболизм мозга, причем более сильно в начальном периоде тЧМТ. В направлении достижения полной интеграции трансплантата с нервной тканью реципиента имеются нераскрытые резервы, заключающиеся в возможности стимулирования такой интеграции с помощью фармакологических средств.

Резюме.

1. ФНТ в раннем периоде тЧМТ имеет специфическое влияние на поддержание содержания дофамина и норадреналина в ткани травмированного полушария и дофамина в диэнцефально-стволовом отделе на уровне величин, присущих для интактных животных.

2. Введение эмбрионального материала в виде суспензии клеток в раннем периоде тЧМТ имеет такое же влияние на возобновление уровня дофамина и норадреналина в травмированном полушарии и диэнцефально-стволовом отделе, как и целостный трансплантат.

3. Трансплантация мышечной ткани не имеет позитивного влияния на динамику изменений катехоламинов в мозге после тЧМТ.

4. Трансплантация ФНТ, проведенная через 5 суток после травмы, не влияет на уровень дофамина и норадреналина в травмированном полушарии, но способствует их увеличению в правом полушарии и диэнцефально-стволовом отделе головного мозга.

РАЗДЕЛ VII

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК НА НЕЙРОСЕКРЕЦИЮ КАТЕХОЛАМИНОВ, ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В КОРЕ И ОТДАЛЕННЫХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В IV разделе работы нами было показано, как изменяются показатели нейросекреции нейромедиаторов в коре и отдаленных структурах головного мозга.

В настоящем фрагменте работы нами изучено влияние трансплантации фетальной нервной ткани на содержание нейромедиаторов в коре и отдельных структурах головного мозга.

Для оценки такого влияния мы использовали 20 крыс. На 10 крысах первой группы мы моделировали тяжелую ЧМТ (см. раздел IV). Крысам второй группы ($n=10$) через 2 часа после травмы в область левого полушария вводили трансплантат фетальной коры. Через 30 дней после травмы животных под наркозом забивали и выделяли все необходимые мозговые структуры для определения нейромедиаторов.

Результаты исследования представлены в таблицах 7.1 и 7.2.

Как видно из представленных данных, трансплантация ФНТ увеличивала на 62,8% ($p<0,05$) содержание ДА в среднем мозге, уменьшала на 51,8% ($p<0,05$) ГВК в левом травмированном полушарии головного мозга, увеличила на 56,3% ($p<0,05$) ГВК в правом полушарии, снизило содержание на 41,2% ($p<0,05$) ГВК в гиппокампе. Обращало на себя внимание, что в тканях продолговатого мозга ГВК увеличивалось в 4,7 раза ($p<0,001$).

В травмированном левом полушарии на 82,6% ($p<0,05$) увеличивалось содержание НА, на 31,1% ($p<0,05$) увеличивалось содержание НА в гиппокампе и на 20,0% ($p<0,05$) в среднем мозге. В стриатуме количество НА, наоборот уменьшалось на 41,2% ($p<0,05$).

Таблица 7.1

Содержание дофамина, гомованилиновой кислоты и норадреналина в тканях головного мозга крыс через 30 дней после тяжелой черепно-мозговой травмы и после тЧМТ+трансплантация ФНТ, в нг/г ткани ($M \pm m$)

Структура головного мозга	Нейромедиаторы					
	тЧМТ (n=10)			тЧМТ+ФНТ		
	ДА	ГВК	НА	ДА	ГВК	НА
Левое (травмирован ное) полушарие	768,6±59,4	2408,0±17 7,0	172,1±11,3 1	857,3±66,9	1160,5±98,8 1,2	314,3±16,6 ¹ 2
Правое полушарие	656,0±38,0	1478,3±10 7,8 ¹	463,7±31,2 1	713,2±52,3	2310,7±157, 4 ²	470,6±18,9 ¹
Гиппокамп	528,4±49,5	2169,3±19 7,6 ¹	456,7±37,1	635,2±39,8	1274,3±100, 4 ^{1,2}	598,8±34,7 ¹ 2
Стриатум	3843,4±22 2,9 ¹	1777,5±10 7,4	3729,1±22 9,7 ¹	4890,4±36 0,5 ¹	1786,5±102, 3	2192,4±133, 5 ^{1,2}
Средний мозг	269,3±11,8 1	1937,5±16 7,4	744,4±57,3	438,5±39,1 2	2150,1±149, 2	893,9±49,6 ¹ 2
Гипоталамус	104,5±7,3	1203,2±10 1,2 ¹	1644,6±12 5,8 ¹	123,3±8,7	1619,8±122, 6	2580,8±139, 6 ²
Продолговат ый мозг	24,9±1,7 ¹	204,3±16,9	831,9±71,5	35,6±2,1 ²	962,3±41,3 ¹ 2	937,1±53,9 ¹ 2

¹ – обозначена достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$),

² – обозначена достоверность различий по сравнению с тЧМТ ($p < 0,05$).

Следует отметить, что изменения количества нейромедиаторов в большинстве указанных структур мозга происходили в направлении величин контроля (интактных животных), т.е. в направлении нормализации уровня нейромедиаторов.

Количество серотонина в тканях стриатума возрастало на 76,7% ($p < 0,05$), а в тканях продолговатого мозга – на 82,0% ($p < 0,01$). Количество 5-ГИУК в тканях гиппокампа увеличивалось на 71,5% ($p < 0,05$), в тканях стриатума – на 39,9% ($p < 0,05$), а в тканях продолговатого мозга – на 62,3% ($p < 0,05$). Величина ГАМК после трансплантации ФНТ снижалась на 27,6% ($p < 0,05$) в гипоталамусе. В остальных тканях не изменялась.

Таблица 7.2

Содержание серотонина, 5-гидроксииндолуксусной и γ -аминомасляной кислот в тканях головного мозга крыс через 30 дней после тяжелой черепно-мозговой травмы и после тЧМТ+трансплантация ФНТ, в нг/г ткани ($M \pm m$)

Структура головного мозга	Нейромедиаторы					
	тЧМТ (n=10)			тЧМТ+ФНТ		
	Сер	5-ГИУК	ГАМК	Сер	5-ГИУК	ГАМК
Левое (травмиро- ванное) полушарие	37,0 \pm 2,0 ¹	136,0 \pm 10,0 ¹	2,7 \pm 0,1	37,3 \pm 3,2 ¹	191,3 \pm 16,5 ²	2,7 \pm 0,1
Правое полушарие	21,5 \pm 1,7 ¹	143,5 \pm 9,8	4,2 \pm 0,3 ¹	47,2 \pm 2,6 ²	174,9 \pm 10,8 ^{1,2}	4,4 \pm 0,2 ¹
Гиппокамп	21,5 \pm 1,7	26,7 \pm 1,4	4,5 \pm 0,3 ¹	26,8 \pm 1,8 ¹	45,8 \pm 3,2 ^{1,2}	4,2 \pm 0,2 ¹
Стриатум	5,6 \pm 0,4 ¹	136,7 \pm 11,2 ¹	4,8 \pm 0,2 ¹	9,9 \pm 0,3 ^{1,2}	191,2 \pm 10,7 ²	4,9 \pm 0,3 ¹
Средний мозг	55,2 \pm 3,1 ¹	112,4 \pm 8,7 ¹	5,1 \pm 0,3 ¹	76,6 \pm 4,2 ²	133,4 \pm 11,3 ¹	3,4 \pm 0,2 ^{1,2}
Гипоталамус	27,9 \pm 1,7 ¹	175,3 \pm 9,2 ¹	5,8 \pm 0,4 ¹	30,1 \pm 2,2 ¹	133,8 \pm 10,6 ²	4,2 \pm 0,2 ^{1,2}
Продолговатый мозг	31,2 \pm 2,3 ¹	59,8 \pm 4,6 ¹	3,9 \pm 0,3 ¹	56,8 \pm 4,2 ^{1,2}	97,1 \pm 7,2 ^{1,2}	3,5 \pm 0,3 ¹

¹ – обозначена достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$),

² – обозначена достоверность различий по сравнению с тЧМТ ($p < 0,05$).

Следует также отметить, что изменения Сер, 5-ГИУК, ГАМК в большинстве тканей мозга после трансплантации ФНТ имели тенденцию к восстановлению.

На рис. 7.1–7.6 представлены соотношения изученных показателей при тЧМТ и тЧМТ после трансплантации ФНТ.

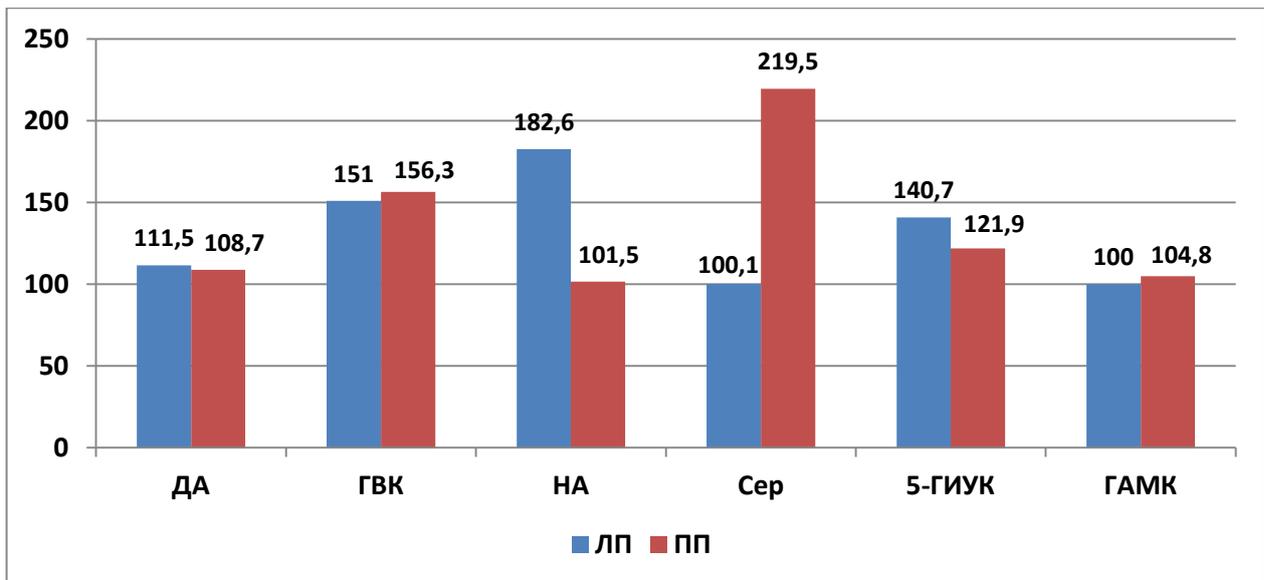


Рис. 7.1. Содержание нейромедиаторов в левом полушарии (ЛП) травмированном и правом полушарии (ПП) после трансплантации ФНТ. За 100% взяты данные тЧМТ; * – обозначена достоверность различий по сравнению с тЧМТ. Примечание: ДА – дофамин, ГВК – гомованилиновая кислота, НА – норадреналин, Сер – серотонин, 5-ГИУК – гидроксииндолуксуная кислота, ГАМК – γ -аминомасляная кислота.

Как видно из этого рисунка, ФНТ через 30 дней после введения полностью восстановила в левом и правом полушарии мозга количество ДА, ГВК и НА, причем ГВК и НА в левом полушарии происходило с избытком. Количество Сер, 5-ГИУК и ГАМК также восстанавливалось. В левом полушарии такое восстановление происходило до нормы, а в правом – превышая норму (без учета ГАМК).

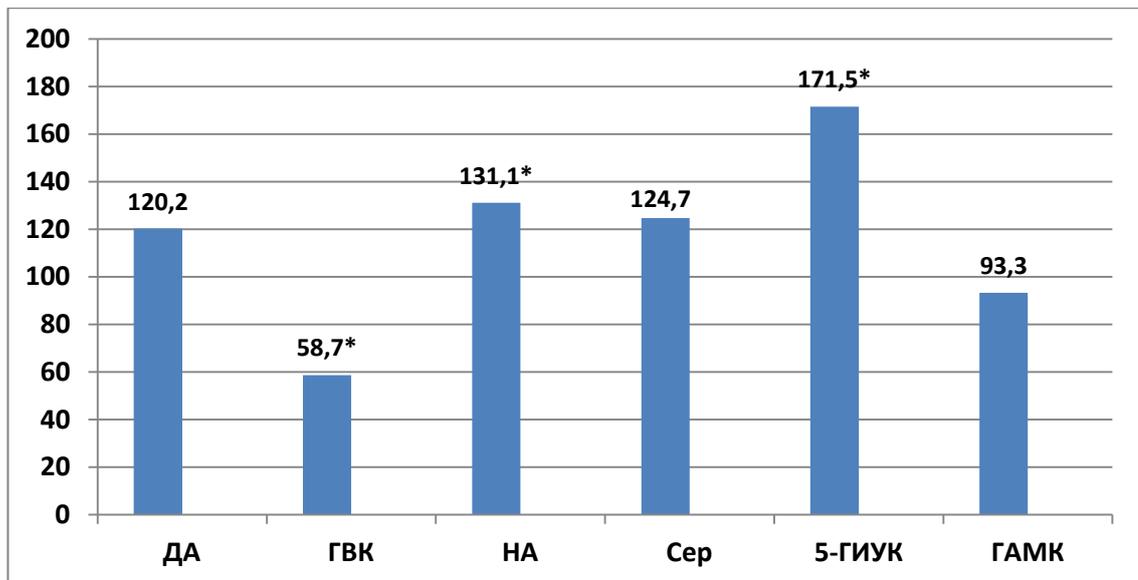


Рис. 7.2. Содержание нейромедиаторов в гиппокампе после трансплантации ФНТ. За 100% взяты данные тЧМТ; * – обозначена достоверность различий по сравнению с тЧМТ. Примечание: ДА – дофамин, ГВК – гомованилиновая кислота, НА – норадреналин, Сер – серотонин, 5-ГИУК – гидроксииндолуксуная кислота, ГАМК – γ -аминомасляная кислота.

Как видно рисунка 7.2, ФНТ через 30 дней после введения полностью восстановила в гиппокампе количество ДА и НА. ГВК оставалось сниженным (истощение резерва ДА). Количество Сер и 5-ГИУК также восстанавливалось (кроме ГАМК).

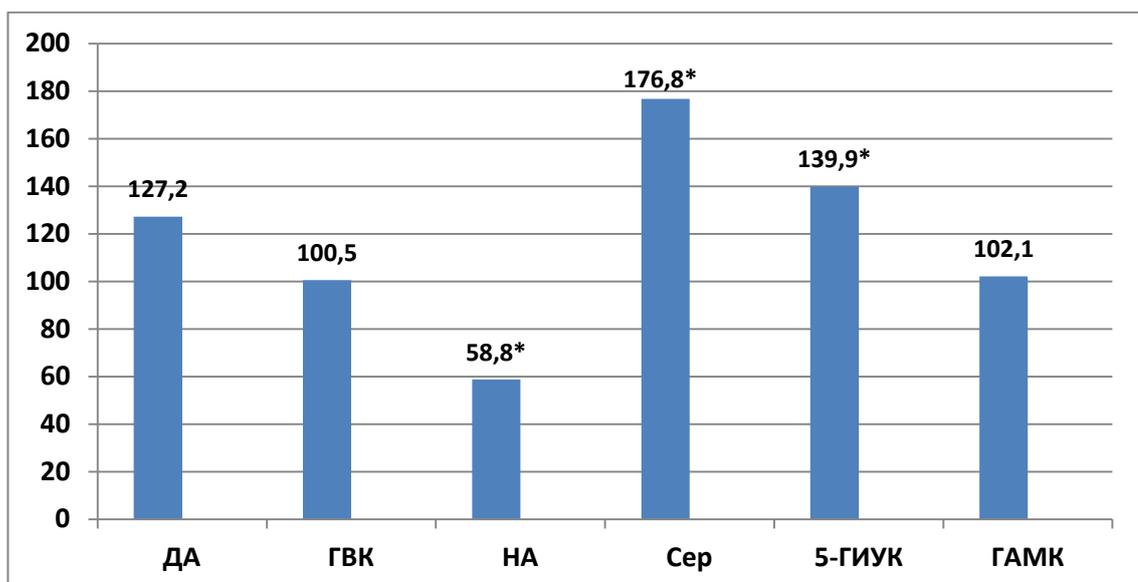


Рис. 7.3. Содержание нейромедиаторов в стриатуме после трансплантации ФНТ. За 100% взяты данные тЧМТ; * – обозначена достоверность различий по сравнению с тЧМТ. Примечание: ДА – дофамин, ГВК – гомованилиновая

кислота, НА – норадреналин, Сер – серотонин, 5-ГИУК – гидроксииндолуксуная кислота, ГАМК – γ -аминомасляная кислота.

Как видно рисунка 7.3, ФНТ через 30 дней после введения полностью восстановила в стриатуме количество ДА и ГВК. Уровень НА оставался сниженным. Количество Сер и 5-ГИУК и ГАМК также восстанавливалось.

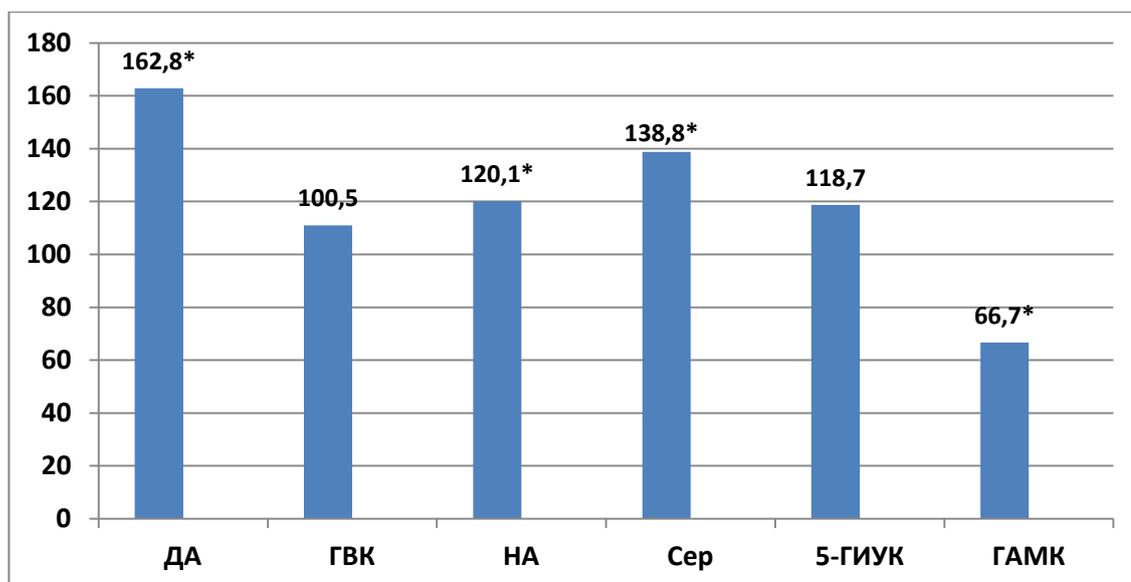


Рис. 7.4. Содержание нейромедиаторов в среднем мозге после трансплантации ФНТ. За 100% взяты данные тЧМТ; * – обозначена достоверность различий по сравнению с тЧМТ. Примечание: ДА – дофамин, ГВК – гомованилиновая кислота, НА – норадреналин, Сер – серотонин, 5-ГИУК – гидроксииндолуксуная кислота, ГАМК – γ -аминомасляная кислота.

Как видно рисунка 7.4, ФНТ через 30 дней после введения полностью восстановила в среднем мозге количество всех нейромедиаторов (за исключением ГАМК).

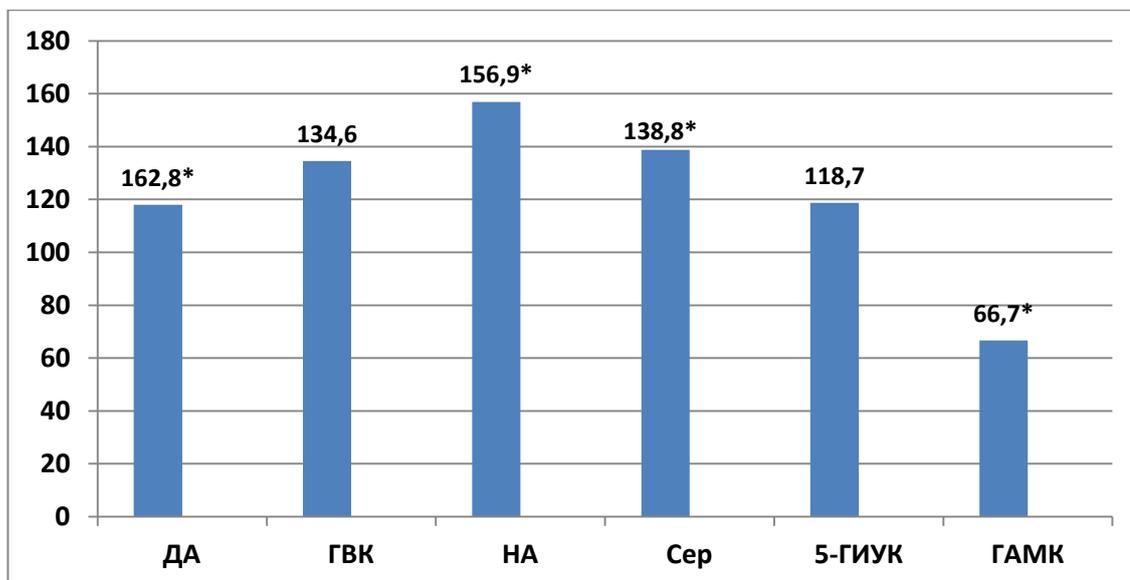


Рис. 7.5. Содержание нейромедиаторов в гипоталамусе после трансплантации ФНТ. За 100% взяты данные тЧМТ; * – обозначена достоверность различий по сравнению с тЧМТ. Примечание: ДА – дофамин, ГВК – гомованилиновая кислота, НА – норадреналин, Сер – серотонин, 5-ГИУК – гидроксииндолуксунная кислота, ГАМК – γ -аминомасляная кислота.

Как и в предыдущем случае, что видно на рисунке 7.5, ФНТ через 30 дней после введения полностью восстановила в гипоталамусе количество всех нейромедиаторов (за исключением ГАМК).

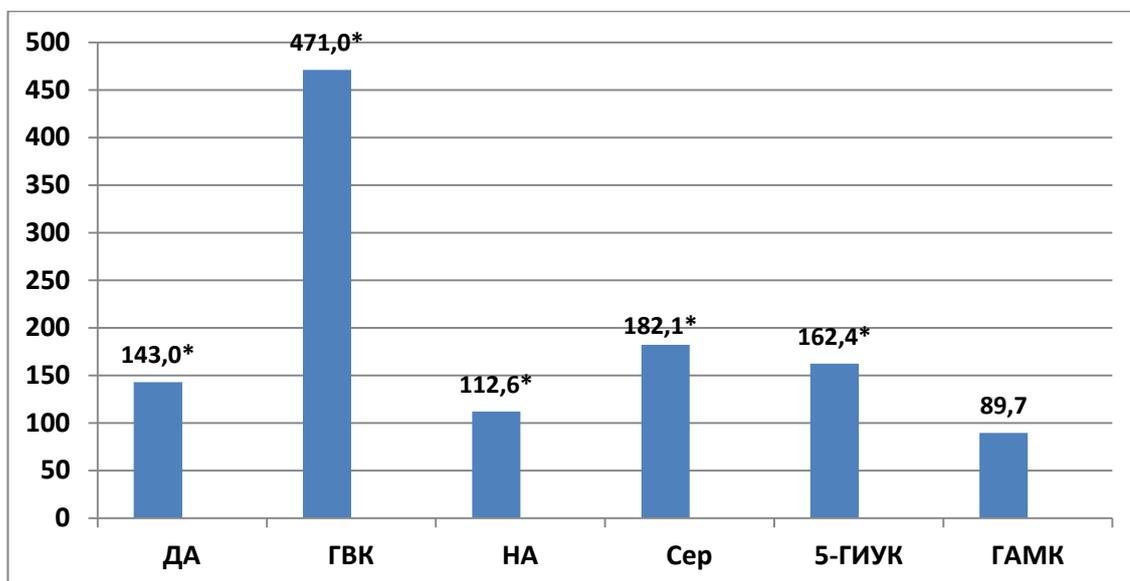


Рис. 7.6. Содержание нейромедиаторов в продолговатом мозге после трансплантации ФНТ. За 100% взяты данные тЧМТ; * – обозначена достоверность различий по сравнению с тЧМТ. Примечание: ДА – дофамин, ГВК – гомованилиновая кислота, НА – норадреналин, Сер – серотонин, 5-ГИУК – гидроксииндолуксунная кислота, ГАМК – γ -аминомасляная кислота.

На рис. 7.6 видно, что ФНТ через 30 дней после введения полностью восстановила в продолговатом мозге количество всех нейромедиаторов (за исключением ГАМК).

Таким образом, при тЧМТ в коре левого (травмированного) полушария, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и продолговатом мозге имеет место снижение содержания нейромедиаторов. Однако ФНТ во всех изученных структурах головного мозга через 30 дней после трансплантации восстанавливала концентрацию почти всех (за исключением ГАМК) нейромедиаторов. В наиболее чувствительной к повреждению структуре головного мозга (в стриатуме) такое восстановление было частичным – без восстановления уровня НА. Повышение концентрации нейромедиатов, вызванное введением трансплантата ФНТ, как правило, происходит с избытком, что указывало о большом лечебном потенциале ФНТ.

Резюме.

1. При тЧМТ в коре левого (травмированного) полушария, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и продолговатом мозге имеет место снижение содержания нейромедиаторов. Однако ФНТ во всех изученных структурах головного мозга через 30 дней после трансплантации восстанавливала концентрацию почти всех (за исключением ГАМК) нейромедиаторов.

2. В наиболее чувствительной к повреждению структуре головного мозга (в стриатуме) такое восстановление было частичным – без восстановления уровня НА. Повышение концентрации нейромедиатов, вызванное введением трансплантата ФНТ, как правило, происходит с избытком, что указывает о большом лечебном потенциале ФНТ.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема эффективного лечения тяжелой черепно-мозговой травмы (тЧМТ) является одной из важнейших в современной травматологии. В настоящее время имеет место пандемическое распространение ЧМТ в связи с увеличением темпа жизни людей, числа транспортных средств, индустриализацией, а также ростом локальных военных конфликтов в мире [8, 11].

Несмотря на имеющиеся успехи в современной травматологии и нейрохирургии восстановление функций головного мозга после тЧМТ составляет сложную медицинскую проблему. В практическом здравоохранении отсутствует эффективная фармакотерапия, а стандартизованные варианты лечения этой патологии разработаны недостаточно [4].

В последнее время появилась возможность для восстановления функции травмированного головного мозга применять стволовые клетки, которые обладают нейропротекторным и нейрорегенеративными свойствами [1, 3]. Для достижения нужного эффекта на животных с тЧМТ апробировано использование стволовых клеток различного генеза – эндогенных нейтральных, эмбриональных (фетальных), индуцированных плюрипотентных и мезенхимальных [2, 3]. Применение экзогенных стволовых клеток для лечения последствий ЧМТ основывается на их способности дифференцироваться и интегрироваться в нейронные сети реципиента, а также производить необходимые трофические факторы [1, 3].

Установлено, что эффективность стволовых клеток разного генеза в лечении тЧМТ примерно одинаковая [11]. В виду высокой пластичности фетальные стволовые клетки являются идеальным источником клеток для трансплантации. В патогенетическом плане вопросы влияния фетальной нервной и мышечной ткани на нейромедиаторный обмен в головном мозге изучены недостаточно, как и сроки оптимальной трансплантации стволовых клеток.

Настоящее исследование проведено с целью установления патогенетического значения расстройств нейросекреции катехоламинов, гамма-

аминомасляной кислоты и их метаболитов в коре поврежденного полушария и отдаленных структурах головного мозга после тяжелой черепно-мозговой травмы и изучения эффективности их коррекции с помощью трансплантата сенсомоторной коры 18 - дневных эмбрионов крыс в эксперименте.

Исследования выполнены на 76 беспородных половозрелых крысах весом 180-220 г. ТЧМТ у 56 крыс моделировали по методике [2]. Удар стандартной силы наносили с помощью пружинного ударника по области черепа с повреждением левой доли коры головного мозга. Травма вызывала разрушение ткани коры головного мозга, повреждение аксонов, ушиб мозга и дисфункцию гематоэнцефалического барьера и по гистологическим критериям и клинической картине соответствовала тяжелой ЧМТ. Для исследования экспрессии гена Вах и содержания фосфолипидов в поврежденной коре головного мозга использовали 20 крыс. Фетальную нервную ткань (ФНТ) получали из мозга 18-ти дневных эмбрионов крыс. Для трансплантации применяли 2 мм³ фетальной нервной ткани из сенсомоторной области коры мозга. В первой группе (n=12) использовали цельную ткань головного мозга, во второй 2 мм³ суспензии клеток из сенсомоторной области коры мозга (n=12). В третьей группе в качестве контроля в область травмированного мозга вводили 2 мм³ фетальной мышечной ткани взятой из бедра крысят (n=12). Каждая группа была поровну разделена на две подгруппы. В первой подгруппе трансплантацию фетальных клеток проводили через 2 часа после моделирования тЧМТ, во второй подгруппе – через 5 суток.

В сериях опыта, в которых изучали эффективность трансплантации фетальных клеток 10 крыс составляли группу сравнения (моделирование ЧМТ) и 10 крыс – контрольную группу.

Всех травмированных животных под гексеналовым наркозом декапитировали через 30 суток после тЧМТ. Из тканей головного мозга выделяли левое (травмированное), правое полушарие и диэнцефально-стволовой отдел. Полученный материал помещали в жидкий азот для хранения и последующего биохимического анализа. Концентрацию дофамина и норадреналина в нервной ткани головного мозга крыс определяли с помощью

хроматографического анализа и электрохимической детекции [6].

В работе использованы следующие методы исследования: моделирование тяжелой ЧМТ, трансплантация фетальных тканей; трансплантация суспензии нервных клеток; исследование экспрессии проапоптического гена Вах, содержание фосфолипидов, катехоламинов (норадреналина и дофамина) и продукта их метаболизма гомованиловой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ); исследование содержания серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты методом ВЭЖХ; исследование содержания гама-аминомасляной кислоты методом флуориметрии; определение белка; статистические методы обработки результатов.

Для определения патогенетической значимости апоптоза и нарушения фосфолипидного обмена в формировании неврологического дефицита при тяжелой черепно-мозговой травме в исследовании использовали две группы крыс: контрольная группа и экспериментальная группа животных с тяжелой ЧМТ (по 10 животных в каждой). Об уровне апоптоза нейронов в очаге повреждения и отдаленных структурах мозга судили по экспрессии гена Вах [22]. В тканях мозга также определяли основные фракции фосфолипидов: фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноамина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, сфингомиелина. Все показатели в группе животных с тЧМТ определяли через 30 суток после травмы.

Установлено, что у животных опытной группы через 30 сут после ЧМТ масса травмированного полушария достоверно уменьшалась по сравнению с таковой у интактных животных на 33%, $p < 0,05$. Уменьшение массы мозга после травматического повреждения связано с процессами первичной и вторичной альтерации нейронов.

Активность апоптического процесса в нейронах и глиальных клетках в коре травмированного полушария через 30 сут после тЧМТ в 2,3 раза ($p < 0,001$) превышала уровень контрольных животных. В это же время в коре левого полушария головного мозга происходило перераспределение основных фракций фосфолипидов: достоверно снижался уровень фосфатидилхолина на 13%

($p < 0,05$) по сравнению с таковым в контроле, повышался уровень фосфатидилэтаноламина на 22% ($p < 0,05$). Содержание фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола и сфингомиелина изменялось менее значительно. Изменение спектра фосфолипидов приводило к нарушению структурно-функционального состояния биомембран. Перераспределение отдельных фракций фосфолипидов, обеспечивающих избирательную проницаемость и транспортную функцию клеточных мембран, приводило также к нарушению плотности поверхностного заряда мембран и изменению активности некоторых ферментов [26].

Таким образом, рост величины апоптоза нейронов и нарушение обмена фосфолипидов в коре (травмированного) левого полушария определяют выраженность неврологического дефицита при тЧМТ.

Для определения патогенетической значимости изменений нейромедиаторов при тЧМТ изучено содержание в коре левого (травмированного) и правого полушария, в гиппокампе, стриатуме, среднем мозге, гипоталамусе и продолговатом мозге количества дофамина (ДА), его метаболита гомованилиновой кислоты (ГВК), норадреналина (НА), серотонина (Сер), его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Установлено, что через 30 дней после ЧМТ в коре левого (травмированного) полушария, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и продолговатом мозге имеет место снижение содержания нейромедиаторов. По выраженности нарушений наиболее чувствительными к повреждению структурами головного мозга являлись стриатум и гипоталамус. В контрлатеральном (правом) полушарии головного мозга после тяжелой ЧМТ имело место компенсаторное повышение норадреналина и ГАМК.

В дальнейшей работе мы изучили влияние трансплантации фетальной нервной ткани на вес коры травмированного полушария большого мозга, апоптоз и липидный ее состав через 1 мес после нанесения экспериментальной ЧМТ. В исследовании использовали самцов 10 беспородных половозрелых крыс массой тела 180-220 г, а также 10 беременных самок с 18-дневными эмбрионами.

Трансплантацию ФНТ проводили через 2 часа после травмы. Операцию выполняли под нембуталовым наркозом - 4 мг/ 100г живого веса.

Исследования массы левого полушария животных после тЧМТ и трансплантации ФНТ показали, что вес левого полушария мозга увеличился на 50 мг ($p < 0,05$), хотя уровня контрольных значений он не достиг. Увеличение массы травмированного отдела мозга после трансплантации ФНТ свидетельствовала о приживлении трансплантата ФНТ.

Изучение процесса апоптоза нейронов и глиальных клеток посредством определения экспрессии гена Вах, являющегося показателем активности апоптических процессов, свидетельствовали о положительном влиянии трансплантации ФНТ на этот показатель. У животных, которым после тЧМТ произведена трансплантация ФНТ, в коре левого (травмированного) полушария отмечено замедление активности процессов апоптоза. По сравнению с уровнем экспрессии Вах животных с травмой без трансплантации оно уменьшилось на 70% ($p < 0,05$). Такое замедление свидетельствовало о нормализации (но не полной) уровня экспрессии Вах (апоптоза).

Результаты изучения соотношения основных фракций фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноамина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, сфингомиелина) в ткани травмированного полушария большого мозга крыс после трансплантации ФНТ показали, что достоверно снижался уровень фосфатидилхолина на 13% ($p < 0,05$) по сравнению с таковым в контроле, повышался уровень фосфатидилэтаноламина на 22% ($p < 0,05$). Содержание фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола и сфингомиелина изменялось менее значительно. Вследствие изменения спектра фосфолипидов нарушалось структурно-функциональное состояние биомембран. В целом, трансплантация ФНТ травмированным животным способствовала сохранению соотношения липидных фракций на уровне контрольных значений.

Одним из механизмов положительного влияния трансплантации ФНТ на течение тЧМТ является опосредованное некоторыми факторами роста фетальной нервной ткани антиапоптотическое воздействие на нейроны поврежденного

полушария, а также в связи с этим изменение топологических и функциональных свойств нейрональной сети мозга, то есть активности его медиаторных систем, путем повышения нейрональной пластичности.

Для оценки влияния трансплантации фетальных нервных клеток на нейросекрецию катехоламинов, γ -аминомасляной кислоты и их метаболитов в коре и отдаленных структурах головного мозга исследования были продолжены.

Сначала мы изучали содержание нейромедиаторов (дофамина и норадреналина) в коре левого полушария (ЛП), правого полушария (ПП) и диэнцефально-стволовом отделе (ДСО) мозга через 30 дней после ЧМТ в сравниваемой группе и в группах после введения фетальных клеток в раннем периоде ЧМТ. Установлено, что при тЧМТ (в сравниваемой группе) содержание дофамина в коре левого (травмированного) полушария мозга относительно уровня интактных животных снижалось на 23% ($p < 0,05$), а норадреналина на 14%. Введение суспензии ФНТ и гомологичного участка этой ФНТ восстанавливало уровень дофамина в коре левого полушария мозга. Между тем, вводимая суспензия количество норадреналина не увеличивала (он оставался на 24% меньше, чем у интактных крыс), а введение в область травмированного мозга гомологичного участка ФНТ – уровень норадреналина восстановило ($p < 0,05$). Введение животным с ЧМТ суспензии фетальных мышечных клеток не способствовало восстановлению в коре величины обеих нейромедиаторов.

Содержание дофамина в коре правого полушария мозга после ЧМТ в сравниваемой группе не изменялось, а норадреналина увеличивалось на 31% ($p < 0,05$). Введение суспензии ФНТ повышало содержание дофамина на 65% ($p < 0,05$), а уровень норадреналина не изменялся. После введения гомологичного участка ФНТ содержание дофамина не увеличивалось, а норадреналина повышалось на 53% ($p < 0,05$). Введение фетальной мышечной ткани уровень нейромедиаторов не изменяло.

Содержание дофамина в диэнцефально-стволовом отделе после ЧМТ в сравниваемой группе было на 23% ($p < 0,05$) меньше, чем у интактных животных, а уровень норадреналина был как у интактных животных. Введение суспензии

фетальной нервной ткани значения исследованных нейромедиаторов не увеличило. Использование с лечебной целью гомологичного участка ФНК нормализовало величину нейромедиаторов. Применение фетальных мышечных клеток оставило значения дофамина и норадреналина в прежних пределах.

Из приведенных результатов исследования следовало, что при тяжелой ЧМТ имеет место глубокое нарушение содержания нейромедиаторов в коре головного мозга, причем больше в травмированном левом полушарии. Содержание дофамина и норадреналина в диэнцефально-стволовом отделе головного мозга не изменялось. Уровень медиаторных нарушений фетальной мышечной тканью не корректируется. Только введение в зону поражения мозга суспензии или гомологичного участка фетальной нервной ткани позволяет восстанавливать содержание нейромедиаторов в левом и правом полушарии головного мозга. Наиболее эффективное восстановление этих показателей наблюдалось после применения гомологичных участков ФНТ.

Большая эффективность гомологичных участков ФНТ по сравнению с суспензией ткани указывает на то, что трансплантированная ФНТ устанавливает контакты с клетками хозяина. Возможность установления синаптических связей в процессе трансплантации ФНТ обусловлено идентичностью контактов между клетками мишенями и интактными клетками ФНТ [9, 10]. Процесс приживления ФНТ существенно тормозится, если в зоне поврежденной нервной ткани имеют место глубокие нарушения микроциркуляции и обмена, в частности, при усилении перекисного окисления липидов. Введение в такое клеточное окружение фрагментов ФНТ подвергается апоптозу и некрозу [3].

В литературе имеются сообщения, которые объясняют, что после трансплантации ФНТ и ее приживлении происходит блокада ретроградной дегенерации дофаминэргических волокон и стимулирование функционирования тел нейронов среднего мозга. Это способствует поддержанию уровня катехоламинов как у интактных животных [2, 12].

Содержание нейромедиаторов (дофамина и норадреналина) в коре ЛП, ПП и ДСО через 30 дней после ЧМТ в сравниваемой группе и в группах после

введения фетальных клеток в позднем периоде ЧМТ (через 5 суток после травмы) показало, что ни суспензия ФНТ, ни ФМТ не восстанавливали сниженный уровень дофамина и норадреналина в ЛП. Суспензия ФНТ и ФМТ не изменяли значения нейромедиаторов в ПП и ДСО.

Пересадка гомологичного участка ФНТ в позднем периоде ЧМТ также не изменяла уровень дофамина в левом и правом полушариях, но увеличивала этот уровень в ДСО в 2,0 раза ($p < 0,05$). Величина норадреналина после пересадки в травмированную зону мозга ФНТ в левом полушарии и ДСО не изменялась, но в правом увеличивалась на 53% ($p < 0,05$).

Увеличение показателей дофамина и норадреналина в неповрежденных зонах мозга, вероятно, следует объяснить действием нейротрофических факторов, содержащихся в участке ФНТ. Однако такой стимулирующий эффект оказывался недостаточным для восстановления значений нейромедиаторов в травмированном левом полушарии головного мозга.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе автором решена важная научная проблема современной патофизиологии: установлено значение расстройств нейросекреции катехоламинов, гамма-аминомасляной кислоты и их метаболитов в коре поврежденного полушария и отдаленных структурах головного мозга после тяжелой черепно-мозговой травмы и дана оценка эффективности их коррекции с помощью трансплантата сенсомоторной коры 18 - дневных эмбрионов крыс в эксперименте.

1. Масса травмированного большого мозга экспериментальных животных через 30 сут после тЧМТ по сравнению с контролем уменьшается на 33% ($p < 0,05$). При этом уровень экспрессии проапоптического гена Вах в коре левого (травмированного) полушария большого мозга крыс увеличивается в 2,3 раза ($p < 0,001$).
2. После тЧМТ нарушается фосфолипидный состав ткани коры травмированного полушария мозга; в наибольшей степени снижается уровень фосфатидилхолина (на 13%, $p < 0,05$), а уровень фосфатидилэтаноламина повышался (на 22%, $p < 0,05$). Рост величины апоптоза нейронов и нарушение обмена фосфолипидов в коре (травмированного) левого полушария определяют выраженность неврологического дефицита при тЧМТ.
3. Через 30 дней после ЧМТ в коре левого (травмированного) полушария, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и продолговатом мозге происходит снижение содержания нейромедиаторов. По выраженности изменений нейромедиаторов наиболее чувствительными к повреждению структурами головного мозга являются стриатум и гипоталамус. В контрлатеральном (правом) полушарии головного мозга после тяжелой ЧМТ имеет место компенсаторное повышение норадреналина и ГАМК. Показатели моноаминергической системы мозга при тяжелой ЧМТ целесообразно использовать в качестве критериев эффективности проводимой экспериментальной фармакотерапии и трансплантации фетальной нервной

ткани.

4. Трансплантация аллогенной фетальной нервной ткани способствует сохранению массы травмированного полушария на контрольном уровне; нормализации (но не полной) уровня экспрессии Вах; восстановлению фосфолипидного состава ткани коры травмированного полушария мозга. ФНТ в раннем периоде тЧМТ имеет специфическое влияние на поддержание содержания дофамина и норадреналина в ткани травмированного полушария и дофамина в диэнцефально-стволовом отделе на уровне величин, присущих для интактных животных. При тЧМТ в коре левого (травмированного) полушария, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и продолговатом мозге имеет место снижение содержания нейромедиаторов. Однако ФНТ во всех изученных структурах головного мозга через 30 дней после трансплантации восстанавливала концентрацию почти всех (за исключением ГАМК) нейромедиаторов.
5. В наиболее чувствительной к повреждению структуре головного мозга (в стриатуме) такое восстановление было частичным – без восстановления уровня НА. Повышение концентрации нейромедиаторов, вызванное введением трансплантата ФНТ, как правило, происходит с избытком, что указывает о большом лечебном потенциале ФНТ. Введение эмбрионального материала в виде суспензии клеток в раннем периоде тЧМТ имеет такое же влияние на возобновление уровня дофамина и норадреналина в травмированном полушарии и диэнцефально-стволовом отделе, как и целостный трансплантат. Трансплантация фетальной мышечной ткани не имеет позитивного влияния на динамику изменений катехоламинов в мозге после тЧМТ. Трансплантация ФНТ, проведенная через 5 суток после травмы, не влияет на уровень дофамина и норадреналина в травмированном полушарии, но способствует их увеличению в правом полушарии и диэнцефально-стволовом отделе головного мозга.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Е.В. Синдромы дисфункции нейромедиаторных систем в процессе восстановления сознания после тяжелой черепно-мозговой травмы: автореф. дис...канд. мед. наук: 14.01.18 / Александрова Е.В. – Москва, 2013. – 23 с.
2. Балябин А.В., Мухина Трансплантация аутологичных нейтральных стволовых клеток обонятельного эпителия в терапии последствий тяжелой черепно-мозговой травмы (обзор) // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – №12. – С. 1606-1612.
3. Бараненко Б.А., Цымбалюк В.И., Васильева И.Г. Особенности метаболизма в травмированном полушарии большого мозга после экспериментальной черепно-мозговой травмы и трансплантации фетальной нервной ткани // Український нейрохірургічний журнал, 2014. – №1. – С. 26-31.
4. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. – Т. 2 / Под ред. М.А. Пальцева. – М.: Медицина: Шико, 2009. – 456 с.
5. Болдырев А.А., Ещенко Н.Д., Илюха В.А., Кайвярайнен Е.И. Нейрохимия. – М.: Дрофа. – 2010. – 480 с.
6. Бонецкий А.А. Определение катехоламинов плазмы крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на микроколоночном хроматографе «Миллихром» / А.А. Бонецкий, В.И. Федоров // Лаб. дело. – 1989. – №4. – С. 21-25. 3.19
7. Брюховецкий А.С. Трансплантация нервных клеток и тканевая инженерия мозга при нервных болезнях. М.: ЗАО «Нейровита». 2003.
8. Брюховецкий А.С., Ушаков С.О. Клинико-патогенетическое обоснование применения фетальных тканей человека при заболеваниях нервной системы. / В кн.: Трансплантация фетальных тканей человека. М., 1996. – С. 53-56.
9. Бер М. Нейропротекция: модели, механизмы, терапия: пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 429 с.
10. Влияние нейротрансплантации на содержание катехоламинов в структурах

- головного мозга крыс после черепно-мозговой травмы / В.И. Цымбалюк, И.Г. Васильева, Н.Г. Чопик и др. // *Нейрофизиология*. – 1998. – Т.30, №1. – С. 36-40.
11. Влияние трансплантации эмбрионального неокортекса на выживаемость крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы / А.П. Ромоданов, О.В. Копьев, В.И. Цымбалюк и др. // *Материалы III междунар. симпозиума «Функциональная нейрохирургия»* (Тбилиси, 28-30 мая 1990 г.). – Тбилиси, 1990. – С. 247.
 12. Гайдар Б.В., Брюховецкий А.С., Шумаков В.И. Результаты и перспективы применения трансплантации клеток нервной ткани человека при боевой травме мозга / *Бюл. эксп. биол. мед.* – 1998. – №126. – Прилож. 1. – С. 133-134.
 13. Гельман В.Я. Компьютерный анализ медицинских данных для аспирантов: учебное пособие. Издание второе / В.Я. Гельман. – СПб МАПО, 2018. – 65 с.
 14. Катунян П.И., Морозов В.Я., Круглов Н.А. Трансплантация в лечении травматического повреждения спинного мозга. / *Материалы III Междунар. Тбилисского симпозиума «Функциональная нейрохирургия»*. Тбилиси. – 1990. – С. 138-139.
 15. Клеменс М. Выделение эукариотической матричной РНК (мРНК) / М. Клеменс // *Транскрипция и трансляция. Методы: пер. с англ.; под ред. Б. Хеймса, С. Хиггинса*. – М.: Мир, 1987. – С. 254-275.
 16. Копьев О.В. Ультраструктурный и ультрацитохимический анализ экспериментального сотрясения мозга: автореф. дис... д-ра мед. наук / О.В. Копьев. – К., 1988. – 46 с. 3.17
 17. Каменская М.А., Каменский А.А. *Основы нейробиологии*. – М.: Дрофа, 2014. – 368 с.
 18. Кафанова М.Ю., Рабинович С.С., Селедцов В.И. и др. Нейротрансплантация в лечении неврологических расстройств у детей. / *Материалы 2-й Межрегиональной научно-практической конференции «Клинические аспекты клеточной и тканевой терапии»*. – 2000 27-28 июня. – Омск, Россия.

– С. 140-142.

19. Леневиц В.В. Нейрохимия: учебное пособие для студентов. – Гродно: ГрГМУ, 2008. – 230 с.
20. Миронов Н.В., Шмырев В.И., Бугаев В.С., Аникин А.Ю. Применение нейротрансплантации фетальных клеток головного мозга в лечении некоторых неврологических заболеваний / В кн.: Трансплантация фетальных тканей человека. М., 1996. – С. 50-52.
21. Нейромедіатори головного мозку щурів у після травматичному періоді та вплив на них трансплантації нервової тканини сенсомоторної кори 18-денних ембріонів / В.І. Цимбалюк, І.Г. Васильєва, Н.Г. Чопик та ін. // Трансплантологія. – 2001. – Т.», №1. – С. 48-53.
22. Николлс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А., От нейрона к мозгу. – М.: Лиبراком, 2012. – 512 с.
23. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
24. Нейрохирургия и нейрореаниматология / под ред. академика РАН, проф. В.В. Крылова. – М.: АБВ-пресс, 2018. – 309 с.
25. Нейротрофические факторы в эмбриональном мозге человека 5-9 недель гестации / В.И. Цымбалюк, И.Г. Васильева, Н.Г. Чопик, Е.С. Галанта, О.И. Цюбко, Н.П. Олексенко, Т.Н. Вашуленко // Материалы III съезда нейрохирургов Украины (Алушта, 23-25 ноябр., 2003 г.) – К., 2003. – С. 199.
26. Носов А.Т., Зозуля Ю.А., Цымбалюк В.И. и др. Влияние трансплантации эмбриональной нервной ткани (ЭНТ) и суспензии клеток эмбриональной нервной ткани (СК ЭНТ) на морфофункциональное состояние головного мозга после тяжёлой черепно-мозговой травмы (ЧМТ). / Макро- и микроуровни организации мозга в норме и патологии: Матер. симпозиума. – М.: НИИ мозга РАМН. – 1992. – С. 112.
27. Патоморфологічні характеристики моделі дозованого травматичного ушкодження півкулі мозочку в експерименті / В.І. Цимбалюк, В.М. Семенова, Ю.Ю. Сенчик, В.В. Медведєв // Укр. нейрохірург. журн. – 2010. –

- №1. – С. 24-31.
28. Рабинович С.С., Селедцов В.И., Астраков С.В. и др. Клеточная терапия в системе реанимации больных с тяжелой черепно-мозговой травмой / Вестник интенсивной терапии. – 2004. – 2004. – №4. – С. 24-27.
 29. Рабинович С.С., Селедцов В.И., Самарин Д.М. Средство для лечения последствий травмы спинного мозга. Патент на изобретение РФ. 2007. №2290939.
 30. Рабинович С.С., Селедцов В.И., Тарабан В.Я. и др. Новые возможности лечения нефрологического дефицита / Материалы 2-й Межрегиональной научно-практической конференции «Клинические аспекты клеточной и тканевой терапии». – 2000 27-28 июня. – Омск, Россия. – С. 151-153.
 31. Реброва Т.Ю. Особенности фосфолипидного состава мембран эритроцитов в условиях постинфарктного кардиосклероза / Т.Ю. Реброва, Д.С. Кондратьева, С.А. Афанасьев // Сиб. мед. журн. – 2011. – Т.26, №1. – С. 131-134.
 32. Савченко С.А. Восстановительная хирургия спинного мозга при его травматическом повреждении (экспериментально-клиническое исследование): Автореферат дисс....канд. мед. наук. М.: 2005.
 33. Селедцов В.И., Рабинович С.С., Кафанова М.Ю. и др. Клеточная трансплантационная технология в лечении тяжелых неврологических расстройств. / Тезисы VI Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 300-летию Санкт-Петербурга и 205-летию Военно-Медицинской академии «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения в многопрофильном лечебном учреждении» – 2003, 22-23 апреля. – Санкт-Петербург, Россия. СПб. – 2003. С. 275-277.
 34. Селедцов В.И., Рабинович С.С., Кащенко Э.А. и др. Иммунологические и клинические аспекты применения клеточной терапии в лечении последствий черепно-мозговой травмы. / / Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – №1. – С. 12-14.
 35. Селедцов В.И., Рабинович С.С., Парлюк О.В. и др. Клеточная терапия

- коматозных состояния / Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – №3. – С. 146-149.
36. Селянина Н.В., Каракулова Ю.В., Ершина О.А. роль нейромедиаторов и цитокинов в патогенезе острой черепно-мозговой травмы // Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. – 2013. – №6(77) – С. 22-27.
37. Семченко В.В., Еренев С.И., Степанов С.С., Сергиенко Г.Г. Трансплантация незрелой нервной ткани в экспериментальной и клинической неврологии. Омск: ГУИПП «Омский дом печати», 2000.
38. Современные представления о патогенезе закрытой черепно-мозговой травмы / И.Г. Васильева, А.Н. Васильев, М.Р. Костюк и др. / Под. ред. Е.Г. Педаченко – К.: ТОВ «Задруга», 1996. – 282 с.
39. Трофимов А.О. Апоптоз нейронов при черепно-мозговой травме / А.О. Трофимов, Л.Я. Кравец // Современ. технологии в медицине. – 2010. – №3. – С. 92-97.
40. Черний В.И., Андропова И.А., Городник Г.А. и др. Нейромедиаторные механизмы восстановления сознания у пациентов с тяжелой ЧМТ // Медицина неотложных состояний. – 2018. – №1(88). – С. 114-121. 4.8
41. Черепно-мозговая травма: учебное пособие / Б.А. Бывальцев и др.; ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, кафедра нейрохирургии и инновационной медицины. Иркутск: ИГМУ, 2018. – 154 с. 4.7. 6.8
42. Цымбалюк В.І. Нейрогенні стовбурові клітини у неврології та нейрохірургії / В.І. Цымбалюк, В.В. Медведєв // Журн. НАМН України. – 2011. – Т.17, №1. – С. 76-80.
43. Цымбалюк В.И. Влияние трансплантации эмбриональной нервной ткани на динамику отека головного мозга при экспериментальной черепно-мозговой травме / В.И. Цымбалюк, И.Н. Щерба, О.В. Гордиенко // Нейрофизиология. – 1998. – Т.30, №3. – С. 36-40.
44. Шевага В.Н. Ранние и отдаленные последствия черепно-мозговой травмы: медико-социальные аспекты и возможности нейропротекции / В.Н. Шевага // Здоров'я України. – 2009. – №5. С. 45.

45. Юрин Н.А. Клинические и нейрофизиологические аспекты нарушения когнитивных функций и двигательных функций при черепно-мозговой травме: дис...канд. мед. наук: 14.01.11 / Н.А. Юрин – Санкт-Петербург, 2017. – 116 с.
46. 72-kDa heat shock protein and mRNA expression after controlled cortical impact injury with hypoxemia in rats / M. Chen, R.S. Clark, P.M. Kochanek [et al.] // J. Neurotrauma. – 1998.–Vol. 15, N 3. – P. 171–181.
47. A population survey found an association between self-reports of traumatic brain injury and increased psychiatric symptoms // K.J. Anstey, P. Butterworth, A.F. Jorm et al. / J. Clin. Epidemiol. – 2004. – Vol. 57, N11. – P. 1202-1209.
48. Advances in management of neurosurgical trauma in different continents // A. Basso, I. Previgleano, J.M. Duarte et. al. World J. Surg. – 2001. – Vol. 25. – P. 1174-1178.
49. Alted Lopez E. Updates on severe traumatic brain injury management // E. Alted Lopez, S.B. Aznarez, M.C. Fernandez / Med. Intensiva. – 2009. – Vol. 33, N1. – P. 16-30.
50. Attenuation of brain nitrostatic and oxidative damage by brain cooling during experimental traumatic brain injury [Электронный ресурс] / J.R. Куо, C.J. Lo, C.P. Chang [et al.] // J. Biomed. Biotechnol. – 2011. – Режим доступа до жури.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21318143>
51. Auxemery Y. Mild traumatic brain injury and postconcussive syndrome: a reemergent questioning // Y. Auxemery // Encephale. – 2012. – Vol. 38, N4. – P. 329-335.
52. Auxemery Y. Mild traumatic brain injury and postconcussive syndrome: a re-emergent questioning / Y. Auxemery // Encephale. – 2012. – Vol. 38, N 4. – P. 329–335.
53. Bakshi A., Barshinger A.L., Swanger S.A. et al. Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation / J. Neurotrauma – 2006. N23. – P. 55-65.
54. Bartus R.T. The calpain hypothesis of neurodegeneration: evidence for a common

- cytotoxic pathway / R.T. Bartus // *Neuroscientist*. – 1997. – Vol. 3. – P. 314–327.
55. Behavioural and morphological outcome of mild cortical contusion trauma of the rat brain; influence of NMDA-receptor blockade / A. Lewen, A. Fredriksson, G.L. Li [et al.] // *Acta Neurochir. (Wien)*. – 1999. – Vol. 141, N2, –P. 193–202.
 56. Benyl L. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: Involvement in tumor survival and progression / L. Benyl, Q. Ping Dou // *PNAS USA*. – 2000. – V.97, N8. – P. 3850-3855.
 57. Biphasic edema after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats reflect early neuronal and late glial damage / J. Nedelcu, M.A. Klein, A. Aguzzi [et al.] // *Pediatr. Res*. – 1999. – Vol. 46, N 3. – P. 297–304.
 58. Bonfanti L. Adult neurogenesis in mammals – a theme with many variations / L. Bonfanti, P. Peretto // *Eur. J. Neurosci*. – 2018. – V.34. – P. 930-950.
 59. Bushnik T. The experience of fatigue in the first 2 years after moderate-to-severe traumatic brain injury: a preliminary report / T. Bushnik, J. Englander, J. Wright // *J. Head Trauma Rehabil*. – 2008. – Vol. 23, N 1. – P. 17–24.
 60. Byvaltsev V.A. A case of successtul treatment of post-traumatic frontal lobe brain abscess in patient during snbacute period of penetrating craniovertebral trauma / V.A. Byvaltsev, A.A. Kalinin, A.F. Khachikyan et al. // *The new Armenian mtdical journal*. – 2015. – Vol. 9. N4. – P. 80-88.
 61. Cerebral apoptosis in severe traumatic brain injury patients: an in vitro, in vivo, and postmortem study / E. Minambres, M.A. Ballesteros, M. Mayorga [et al.] // *J. Neurotrauma*. – 2008. – Vol. 25, N 6. – P. 581–591.
 62. Cerebral trauma-induced changes in corpus striatal dopamine receptor subtypes / J.M. Henry, N.K. Talukder, A.B. Lee, M.L. Walker // *J. Invest. Surg*. – 1997. – Vol. 10, N 5. – P. 281–286.
 63. Changes in local cerebral glucose utilization, DC potential and extracellular potassium in various degree of experimental cerebral contusion / M. Kubota, T. Nakamura, K. Sunami [et al.] // *No To Shinkei*. - 1989. – Vol. 41, N 8. - - P. 799–805.
 64. Cicchetti F., Fodor W., Deacon T.W. et al. Immune parameters relevant to neural

- xenograft survival in the primate brain. / *Xenotransplantation* – 2003. N10. – P. 41-49.
65. Clinical significance of CSF glutamate concentrations following severe traumatic brain injury in humans / J.I. Brown, A.J. Baker, S.J. Konasiewicz, R.J. Moulton // *J. Neurotrauma*. – 1998. – Vol. 15, N 4. – P. 253–263.
 66. Correlation between catecholamine levels and outcome in patients with severe head trauma / F. Salehpoor, A.M. Bazzazi, R. Estakhri, M. Zaheri, B. Asghari // *Pak. J. Biol. Sci.* – 2010. – V.13, №15. – P. 738-742.
 67. Correlation between catecholamine levels and outcome in patients with severe head trauma / Salehpoor F., Bazzazi A.M., Estakhi R. et al. // *Pak. J. Biol. Sci.* – 2010. – V13, N15. – P. 738-742.
 68. D2 receptor imaging with iodine-123-iodobenzamide brain SPECT in infants with hypoxic- ischemic brain injury / L.O. Kapucu, E. K09, K. Gucuyener [et ah] // *J. Nucl. Med.* – 1998. – Vol. 39, N 10. – P. 1703–1707.
 69. Das M. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury [Электронный ресурс] / M. Das, S. Mohapatra, S.S. Mohapatra// *J. Neuroinflammation*. – 2012. – Vol. 9. – P. 236. – Режим доступа к журн.: <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/236>
 70. Decreasing adrenergic or sympathetic hyperactivity after severe traumatic brain injury using propranolol and clonidine (DASH After TBI Study): study protocol for a randomized controlled trial / M.B. Patel, J.W. McKenna, J.M. Alvarez [et al.] // *Trials*. – 2012. – P. 13–177.
 71. Effects of mild traumatic brain injury on immunoreactivity for the inducible transcription factors c-Fos, c-Jun, JunB, and Krox-24 in cerebral regions associated with conditioned fear responding / D.N. Abrous, J. Rodriguez, M. le Moal [et ah] // *Brain Res.* – 1999. – Vol. 826, N 2, –P. 181–192.
 72. Elder G.A. Research update: neurogenesis in adult brain and neyropsychiatric disosrders / G.A. Elder, R.De Gasperi, M.A. Gama Sosa // *Mt. Sinal J. Med.* – 2006. – V73, N7. – P. 931-940.
 73. Evans J.P. Histologic studies of the brain following head trauma: post-traumatic

- cerebral swelling and edema / J.P. Evans, I.M. Scheinker // *J. Neurosurg.* – 1945. – Vol. 2. – P. 306-314.
74. Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study / A.I. Qureshi, Z. Ali, M.F. Suri [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2003. – Vol. 31, N5. –P. 1482-1489.
75. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury / R. Bullock, A. Zaunr, J.J. Woodward [et al.] // *J. Neurosurg.* – 1998. – Vol, 89, N 4. – P. 507–518.
76. Farooqui A.A. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders / A.A. Farooqui, L.A. Horrocks, T. Farooqui // *Chem. Phys. Lipids.* – 2017. – V.106, N1. – P. 1-29.
77. Focal brain injury and its effects on cerebral mantle, neurons, and fiber tracks / M.A. Matthews, M.E. Carey, J.S. Soblosky [et al.] // *Brain Res.* – 1998. – Vol. 794, N 1. – P. 1–18.
78. Free radical-induced lipoperoxidation and severe head injury: A clinical study / M. Bochicchio, N. Latronico, D.G. Zani [et al.] // *Intensive Care Med.* – 1990. – Vol. 16, N 7. _ p. 444–447.
79. Freire M.A. Pathophysiology of neurodegeneration following traumatic brain injury / M.A. Freire // *West Indian Med. J.* – 2012. – V61, N7. – P. 751-755.
80. Freire M.A. Pathophysiology of neurodegeneration following traumatic brain injury / M.A. Freire // *West Indian Med. J.* – 2012. – V.61, №7. – P. 751-755.
81. Glial proteome changes in response to moderate hypothermia / J.H. Kim, Y.E. Cho, M. Seo [et al.] // *Proteomics.* – 2012. – P. 2571–2583.
82. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia / M.Y. Globus, O. Alonso, W.D. Dietrich [et al.] // *J. Neurochem.* – 1995. – Vol. 65. – P. 1704–1711.
83. Greve M.W. Pathophysiology of traumatic brain injury // *J. Med.* – 2009. – Vol. 76, N2. – P. 97-104.
84. Guerit J.M. Evoked potentials in severe brain injury / J.M. Guerit // *Prog. Brain*

- Res. – 2005. – Vol. 150. – P. 415–426.
85. Haddad S.H. Critical care management of severe traumatic brain injury in adults [Электронный ресурс] // S.H. Haddad, Y.M. Arabi / Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3298793/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3298793/).
 86. Hall E.D. Brain hydroxyl radical generation in acute experimental head injury / E.D. Hall, P.K. Andrus, P.A. Yonkers // J. Neurochem. – 1993. – Vol. 60, N 2. – P. 588–594.
 87. Hall E.D. Free radicals in CNS injury / E.D. Hall, J.M. Braughler // Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. – 1993. – Vol. 71. – P. 81–105.
 88. Hattiangady B. Neural stem cell grafting counteracts hippocampal injury-mediated impairments mood, memory, and neurogenesis / B. Hattiangady, A.K. Shetty // Stem Cells Transl. Med. – 2012. – V. 1. N9. – P. 696-708.
 89. Heath D.L. Secondary mechanisms in traumatic brain injury: a nurse's perspective / D.L. Heath, R. Vink R. // J. Neurosci. Nurs. – 1999. – V31, N2. – P. 97-105.
 90. Heath D.L. Secondary mechanisms in traumatic brain injury: a nurse's perspective / D.L. Heath, R. Vink // J. Neurosci. Nurs. – 1999. – V.31, №2. – P. 97-105.
 91. Henry I.M. Talukder N.K., Lee A.B. et al. Cerebral trauma-induced changes in corpus striatum dopamine receptor subtypes // J. Invest. Surg. – 2019. – Vol. 10, N5. – P. 97-104.
 92. H-magnetic resonance spectroscopy-determined cerebral lactate and poor neurological outcomes in children with central nervous system disease / S. Ashwal, B.A. Holshouser, G. Tomasi [et al.] // Ann. Neurol. – 1997. – Vol. 41, N 4. – P. 70–78.
 93. Inci S. Time-level relationship for lipid peroxidation and the protective effect of alpha-tocopherol in experimental mild and severe brain injury / S. Inci, O.E. Ozcan, K. Kilin? // Neurosurgery. – 1998. – Vol. 43, N 2. – P. 330–335.
 94. Inhibition of calpain and caspase-3 prevented apoptosis and preserved electrophysiological properties of voltage-gated and ligand-gated ion channels in

- rat primary cortical neurons exposed to glutamate / S.K. Ray, S. Karmakar, M. W. Nowak, N.L. Banik // *Neuroscience*. – 2006. – Vol. 139, N 2. P. 577–595.
95. Intellectual, behavioral, and social outcomes of accidental traumatic brain injury in early childhood / L.M. Crowe, C. Catroppa, F.E. Babl, V. Anderson // *Pediatrics*. -2012. – Vol. 129, N 2. – P. 262–268.
96. Kanelos S.K., Neural transplantation: potential role in traumatic brain injury / S.K. Kahelos, J.T. Mc Deavitt // *J. Htad Trauma Rehabil*. – 1998. – V. 13, N6. – P. 1-9. 3.9
97. Kates M. *Techniques of lipidology* / M. Kates – Amsterdam, New-York: Oxford, 1986. – 464 p.
98. Kesslak J.P., Walencewicz A., Calin L. et al. Hippocampal but not astrocyte transplants enhance recovery on a forced choice alternation task after kainite lesions. / *Brain Res*. – 1988. – N454. P. 347-354.
99. Kobori N. Altered adrenergic receptor signaling following traumatic brain injury contributes to working memory dysfunction / N. Kobori, B. Hu, P.K. Dash // *Neuroscience*. – 2011. – V.172. – P. 293-302.
100. Kontos H.A. Super oxide production in experimental brain injury / H.A. Kontos, E.P. Wei // *J. Neurosurg*. – 1986. – Vol. 64, N 5. – P. 803–807.
101. Kopyev O.V., Bragin A.G., Pichkour L.D. Grafting of embryonal brain tissue helps to survival of the rats after severe cranio-cerebral trauma. / *Restor. Neurol. and Neurosci*. – 1990. – N1. – P. 139.
102. Krishnappa I.K. Regional changes in cerebral extracellular glucose and lactate concentration following severe cortical impact injury and secondary ischemia in rats / I.K. Krishnappa, C.F. Contant, C. Robertson // *J. Neurotrauma*. – 1999. – Vol. 16, N 3. – P. 213–224.
103. Lee M.H., Rabe A. Protective effects of fetal neocortical transplants on cognitive function and neuron size in rats with congenital microencephaly. *Behav. / Brain Res*. – 1998. N90. – P. 147-156.
104. Lepore A.C., Bakshi A., Swanger S.A. et al. Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the

- lumbar cord. / *Brain Res.* – 2005. – N1045. P. 206-16.
105. Lewen A. Free radical pathways in CNS injury / A. Lewen, P. Matz, P.H. Chan // *J. Neurotrauma.* – 2000. – Vol. 17. – P. 871–890.
106. Lingren S. Fluorimetric method for determination of GABA in tissue following cation exchange chromatography and condensation with o-phtalaldehyde / S. Lingren, M.E. Andren, M.A. Grabovska-Andren // *J. Neur. Transmis.* – 1989. – V.55. – P. 243-252.
107. Loane D.J. Role of microglia in neurotrauma / D.J. Loane, K.R. Byrnes // *Neurotherapeutics.* – Vol. 7, N 4. – P. 366–377.
108. Lores-Garcia J.C., Fernandez-Ruiz J., Bermudez-Rattoni R., Tapia R. Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. / *Brain Res.* – 1990. N523. P. 105-110.
109. Lyjin A.A., Mering T.A. Victorov I.V. Cultured hippocampal tissue grafts ameliorate the acquisition of conditioned reflex to time in the rats with neurocytotoxic lesion of hippocampal structures. Proceedings of the Constituent Cong. Int. Soc. for Pathophysiol. – 1991 May 28-june 1; Moscow, Russia. Abstr.-Kuopio. – 1991. P. 339.
110. Marshall L.F. Epidemiology and cost of central nervous system injury // L.F. Marshall / *Clin. Neurosurgery.* – 2000. – Vol. 46. – 105-112.
111. Mechanisms of secondary degeneration in the central nervous system during acute neural disorders and white matter damage / J.S. Guimaraes, M.A. Freire, R.R. Lima [et al.] // *Rev. Neurol.* – 2009. – Vol. 48, N 6. – P. 304–310.
112. Modified calcium accumulation after controlled cortical impact under cyclosporin A treatment: a ⁴⁵Ca autoradiographic study / M.J. Mirzayan, P.M. Klinge, S. Ude [et al.] // *Neurol. Res.* – 2008. – Vol. 30, N 5. – P. 476–479.
113. Momeni H.R. Calpain activation and apoptosis in motor neurons of cultured adult mouse spinal cord / H.R. Momeni, S. Azadi, M. Kanje // *Funct Neurol.* – 2007. – Vol. 22, N 2. – P. 105–110.
114. Momeni H.R. Role of calpain in apootosis / Momeni HR. // *Cell J.* – 2011. – Vol. 12.

115. Neuroprotective effect of hypothermia on neuronal injury in diffuse traumatic brain injury coupled with hypoxia and hypotension / M. Yamamoto, C.R. Marmarou, M.F. Stiefel [et al.] // *J. Neurotrauma*. – 1999. – Vol. 16, N 6. – P. 487–500.
116. NMDA receptor activation contributes to a portion of the decreased mitochondrial membrane potential and elevated intracellular free calcium in strain-injured neurons / S.M. Ahmed, J.T. Weber, S. Liang [et al.] // *J. Neurotrauma*. – 2002. – Vol. 19. – P. 1619– 1629.
117. Nonspecific white matter degeneration following traumatic brain injury / S.D. Gale, S.C. Johnson, E.D. Bigler, D.D. Blatter // *J. Int. Neuropsychol. Soc.* – 1995. – Vol. 1, N1. – 138.
118. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats / D. Awasthi, D.F. Church, D. Torbati [et al.] // *Surg. Neurol.* – 1997. – Vol. 47. – P. 575–581.
119. Packard R.C. Epidemiology and pathogenesis of posttraumatic headache // R.C. Packard // *J. Head Trauma Rehabil.* – 1999. – Vol. 14, N1. – P. 9-21.
120. Park E. Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? // E. Park, J.D. Bell, A.J. Baker / *CMAJ*. – 2008. – Vol. 178, N9. – P. 1163-1170.
121. Patient age and outcome following severe traumatic brain injury: an analysis of 5600 patients // C.W. Hukkelhoven, E.W. Steyerberg, A.J. Rampen et al. / *J. Neurosurg.* – 2003. – Vol. 99, N4. – P. 666-673.
122. Patt S. Neuropathological sequelae of traumatic injury in the brain. An overview / S. Patt, N. Brodhun // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 1999. – V. 51, N2. – P. 119-123.
123. Pharmacologically induced calcium oscillations protect neurons from increases in cytosolic calcium after trauma / D.M. Geddes-Klein, G. Serbest, M.N. Mesfin [et al.] // *J. Neurochem.* – 2006. – Vol. 97, N 2. – P. 462–474.
124. Popovic V. GFI deficiency as the most common pituitary defect after TBI: clinical implications / V. Popovic // *Pituitary*. – 2005. – Vol. 8. – P. 239–243.
125. Portera-Cailliau C. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum / C. Portera-Cailliau, D.L. Price, L.J. Martin // *J. Comp. Neurol.* – 1997. – Vol. 378. – P. 88–104.

126. Prevalence of impairments 5 years after a head injury, and their relationship with disabilities and outcome / F. Masson, P. Maurette, L.R. Salmi [et al] // *Brain Inj.* – 1996. – Vol. 10, N 7. – P. 487–497.
127. Purinergic signaling induces cyclooxygenase-1-dependent prostanoid synthesis in microglia: roles in the outcome of excitotoxic brain injury / J. Anrather [et al.]// *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, N 10. – Режим доступа к журн.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022466>
128. Rabinovich S.S., Seledtsov V.I., Poveschenko O.V. et al. Transplantation treatment of spinal cord injury patients / *Biomed. Pharmacother.* – 2003. N57. P. 428-433.
129. Rao M.S., Mayer-Proschel M. Precursor cells for transplantation. / *Prog. Brain Res.* – 2005 128. – P. 273-292.
130. Rao V. Sleep disturbances following traumatic brain injury / V. Rao, P. Rollings // *Curr. Treat. Options Neurol.* – 2002. – Vol. 4. – P. 77–87.
131. Ravagnan L. Mitochondria, the killer organelles and their weapons / L. Ravagnan, T. Rounder, G. Kroemer // *J. Cell. Physiol.* – 2002. – Vol. 192, N 2. – P. 131–137.
132. Richardson R.M. Neurogenesis after traumatic brain injury / R.M. Richardson, D. Sun, M.R. Bullock // *Neurosurg. Clin. N. Am.* – 2007. – V18. – P. 169-181.
133. Riggio S. Neurobehavioral sequelae of traumatic brain injury // S. Riggio, M. Wong / *Mt. Sinai J. Med.* – 2009. – Vol. 76, N2. – P. 163-172.
134. Role of glycemia in acute spinal cord injury. Data from a rat experimental model and clinical experience / F. Sala, G. Menna, A. Bricolo, N. Young // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 890. – P. 133–154.
135. Sasaki M., Honmou O., Akiyama Y. et al. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons / *Glia* – 2001. N35 – P. 26-34.
136. Sato M. Involvement of the endothelin receptor subtype A in neuronal pathogenesis after traumatic brain injury / M. Sato, L.J. Noble // *Brain Res.* – 1998. – Vol. 809, N 1. – P. 306-314.
137. Schmidt R.H., Bjorklund A., Stenevi U. Intracerebral grafting of dissociated CNS

- tissue suspensions: a new approach for neuronal transplantation to deep brain sites // *Brain Res.* – 1981. – V.61, N1-2. – P. 347-356.
138. Seledtsov V.I., Rabinovich S.S., Parlyuk O.V. et al. Cell transplantation therapy in reanimating severely head-injured patients. / *Biomed. Pharmacother.* – 2005. N59. – P. 415-420.
139. Serum S-I 00B protein in severe head injury / A. Raabe, C. Grolms, O. Sorge [et al.] // *Neurosurgery.* – 1999. – Vol. 45, N 3. – P. 477–483.
140. Smith P.M., Blakemore W.F. Porcine neural progenitors require commitment to the oligodendrocyte lineage prior to transplantation in order to achieve significant remyelination of demyelinated lesions in the adult CNS. / *Eur. J. Neurosci.* – 2000. – N12. – P. 2414-2424.
141. Stoica B.A. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury / B.A. Stoica, A.I. Faden // *Neurotherapeutics.* – 2010. – Vol. 7, N 1. – P. 3–12.
142. Sustained sensory/motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse / G.B. Fox, L. Fan, R.A. Levasseur, A.I. Faden // *J. Neurotrauma.* – 1998. – Vol. 15, N8. – P. 599–614.
143. Synergistic effects of transplanted adult neural stem / progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord / S. Karimi-Abdolrezaee, E. Eftekharpour, J. Wang, D. Schut, M.G. Fehlings // *J. Neurosci.* – 2010. – V.30, N5. – P. 1657-1676.
144. Tang Y.P. Involvement of activation of dopaminergic neuronal system in learning and memory deficits associated with experimental mild traumatic brain injury / Y.P. Tang, Y. Noda, T. Nabeshima // *Eur. J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 9, N 8. – P. 1720–1727.
145. Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury / R. Beer, G. Franz, A. Srinivasan [et al.] // *J. Neurochem.* – 2000. – Vol. 75, N 3. – P. 1264–1273.
146. The association between head injuries and psychiatric disorders: findings from the New Haven NIMH Epidemiologic Catchment Area Study / Silver JM, Kramer R,

- Greenwald S, Weissman M. // *Brain Inj.* – 2001. – Vol. 15. – P. 935–945.
147. The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic / T. Abe, A. Kunz, M., Shimamura [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* – 2009. – Vol. 29, N 1. – P. 66–72.
148. The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury / A. Buki, R. Siman, J.Q. Trojanowski, J.T. Povlishock // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1999. – Vol. 58, N 4. – P. 365–375.
149. Therapeutic hypothermia for severe traumatic brain injury: a critically appraised topic / Kramer C, Freeman WD, Larson JS [et al.] // *Neurologist.* – 2012. – Vol. 18, N 3. – P. 173–177.
150. Traumatic brain injury in pediatric patients // N. Stocchetti, V. Conte, L. Ghisoni et al. / *Minerva Anesthesiol.* – 2010. – Vol. 76, N12. – P. 1052-1059.
151. Traumatic brain injury in young children: postacute effects on cognitive and school readiness skills / H.G. Taylor, M.D. Swartwout, K.O. Yeates [et al.] // *J. Int. Neuropsychol. Soc.* – 2008. – Vol. 14, N 5. – P. 734–745.
152. Traumatic brain injury reduces striatal tyrosine hydroxylase activity and potassium-evoked dopamine release in rats / S.S. Shin, E.R. Bray, C.Q. Zhang, C.E. Dixon // *Brain Res.* – 2019. – V. 1369. – P. 208-215.
153. Uomoto J.M. Traumatic brain injury and chronic pain: differential types and rates by head injury severity // J.M. Uomoto, P.C. Esselman / *Arch. Phys. Med. Rehabil.* – 1993. – Vol. 74, N1. – P. 61-64.
154. Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans / J. Qiu, M.J. Whalen, P. Lowenstein [et al.] // *J. Neurosci.* – 2002. – Vol. 22, N 9. – P. 3504–3511.
155. Van Reekum R. Can traumatic brain injury cause psychiatric disorders? / R. van Reekum, T. Cohen, J. Wong // *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* – 2000. – Vol. 12, N 3. – P. 316–327.
156. Wu S., Suzuki Y., Kitada M. et al. New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat /

- Neurosci. Lett. – 2002. N318. P. 81-84.
157. Yakovlev A.G. Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury / A.G. Yakovlev, A.I. // Mol. Neurobiol. – 2001. – Vol. 24. – P. 131–144.
158. Yang S.Y. Determination and clinical significance of plasma levels of prostaglandins in patients with acute brain injury / S.Y. Yang, Z. Gao // Surg. Neurol. – 1999. – Vol. 52, N 3. –P. 238–245.
159. Ying W. Oxidative stress and NAD⁺ in ischemic brain injury: current advances and future perspectives / W. Ying, Z.G. Xiong // Cuit. Med. Chem. – 2010. – Vol. 17, N 20. – P. 2152–2158.