

УДК 577.1:591.481.1:616-001-036.17-089.843:591.3:591.88

БАРАНЕНКО Б.О.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ

## ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕГЕНЕРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У НОРАДРЕНАЛІНЕРГІЧНИХ СИСТЕМАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ З ТЯЖКОЮ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВОЮ ТРАВМОЮ ТА ВПЛИВ НА НИХ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ФЕТАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ

**Резюме.** Проведено дослідження вмісту норадреналіну та рівня експресії гена *Bax* у корі лівої та правої півкулі, гіпоталамусі, гіпокампі та середньому мозку щурів через 30 днів після експериментальної тяжкої черепно-мозкової травми та трансплантації фетальної нервової тканини. Встановлено, що тяжка черепно-мозкова травма призводить до зниження вмісту норадреналіну в корі травмованої півкулі та гіпоталамусі, а також до підвищення рівня проапоптичного гена *Bax* у всіх досліджених структурах головного мозку, що свідчить про наявність деструктивних процесів у мозку тварин у віддалений період після травми. Трансплантація фетальної нервової тканини експериментальним щурам з тяжкою черепно-мозковою травмою сприяла нормалізації досліджуваних показників.

**Ключові слова:** тяжка черепно-мозкова травма, трансплантація фетальної нервової тканини, норадреналін, апоптоз.

Тяжка черепно-мозкова травма (тЧМТ) є однією з найбільш поширених причин інвалідизації та смертності населення молодого та середнього віку. ТЧМТ викликає первинні локальні та вторинні генералізовані органічні зміни в нервовій тканині, що стають фактором ризику розвитку різноманітних віддалених післятравматичних ускладнень у центральній нервовій системі та в організмі в цілому. В основі розвитку значної частини віддалених наслідків тЧМТ лежить пошкодження інтегруючих систем мозку [1].

Важливим моментом міжклітинної інтеграції в нервовій тканині є система нейромедіаторів, на якій базується формування структурно-функціональної мозаїчності мозку. Виходячи з цього, необхідним є вивчення питання щодо стану основних нейромедіаторних систем мозку в умовах черепно-мозкової травми, серед яких важливе місце посідає норадреналінергічна система мозку. Норадреналінергічну систему вважають інтегратором поведінкового збудження та автономних функцій; з порушенням її функціонування пов'язують розвиток серцево-судинних захворювань, психічних порушень, епілепсії [2].

Незважаючи на поглиблене вивчення причин виникнення вторинного тканинного дефіциту, який розвивається після ЧМТ, механізм регуляції загибелі нейронів до кінця не встановлений. Відстрочена загибель нейронів після травми мозку більше пов'язується з процесами апоптозу нейронів та гліальних клітин, і саме апоптоз вважається визначальним фактором у патофізіології [3]. Проте наявні в літературі дані щодо загибелі клітин головного мозку після ЧМТ стосуються, як правило, гострого післятравматичного періоду, тоді як у віддалені терміни ці процеси залишаються менш вивченими.

Сьогодні продовжується пошук молекул, здатних ефективно інгібувати каскадні механізми загибелі

### Адреса для листування з автором:

Бараненко Б.О.  
04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32  
Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова  
НАМН України

© Бараненко Б.О., 2014

© «Міжнародний неврологічний журнал», 2014

© Заславський О.Ю., 2014

нейронів та компонентів нейроглії. Останнім часом набула розвитку та теоретичного обґрунтування тканинна терапія. Найбільш ефективною для досягнення поставленої мети вважається фетальна нервова тканина (ФНТ) [4].

Зважаючи на важливу роль процесів апоптозу у патогенезі черепно-мозкової травми та високу чутливість до впливу черепно-мозкової травми нейронів норадреналінергічних систем мозку, ми провели дослідження рівня експресії проапоптотичного гена Вах, а також умісту норадреналіну в структурах головного мозку щурів, яким була нанесена тяжка ЧМТ, та впливу на ці показники трансплантації фетальної нервової тканини (тФНТ).

## Матеріали й методи дослідження

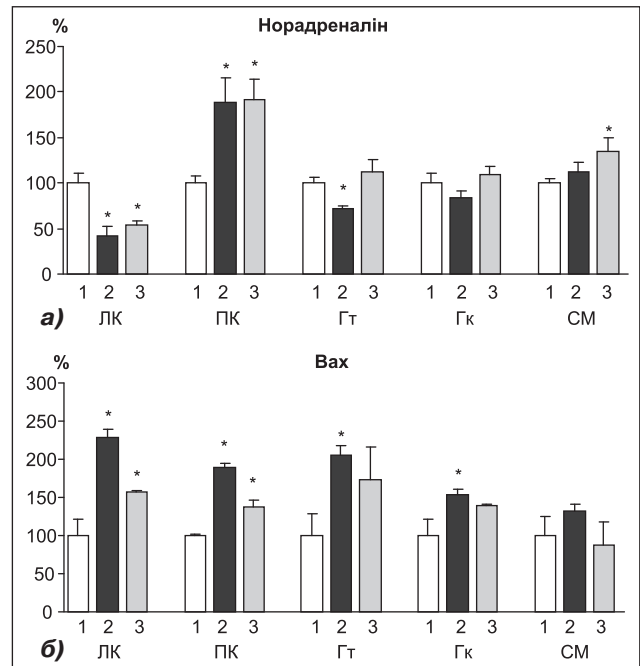
У дослідженні використовували самців безпородних статевозрілих білих щурів масою 180–220 г, а також вагітних самок з 18-денними ембріонами.

Для моделювання тяжкої черепно-мозкової травми застосовували пружинний ударник, модифікований для нанесення травм малим лабораторним тваринам [5]. Удар наносили в ліву тім'яно-скроневу ділянку. При цьому тварин не фіксували.

Для трансплантації використовували фетальну нервову тканину сенсомоторної ділянки кори мозку 18-денних плодів щурів. Перед трансплантацією видаляли тканинний детрит, що утворився у травмованій ділянці. У лунку після хірургічної обробки вводили 2 мм<sup>3</sup> ембріональної нервової тканини. Трансплантацію проводили через 2 години після нанесення тЧМТ. Для анестезії застосовували нембутал (4 мг/100 г живої ваги). Тварин експериментальних груп декапітували через 30 діб після нанесення травми та трансплантації одночасно з тваринами контрольної групи. Вилучену після декапітації тканину окремих структур головного мозку швидко заморожували у рідкому азоті.

Визначення норадреналіну здійснювали методом високоефективної рідинної хроматографії з електрохімічним детектуванням [6]. Хроматографію здійснювали на мікроколунковому хроматографі «Милліхром» (Росія).

Екстракцію РНК здійснювали фенольним методом у присутності детергентів та інгібіторів нуклеаз [7]. Вихід та чистоту препарату РНК оцінювали за поглинанням проби при 260 та 280 нм. КДНК синтезували з використанням 1–2 мкг РНК та 100 нг оліго(дТ)<sub>12–18</sub> в 10 мкл розчину, що містив 50 мМ Трис-НСІ, рН 8,3, 75 мМ КСІ, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ дитіотрейтолу, суміш дНТФ (1 мМ кожного) та 200 од М-Мlv зворотної транскриптази (рекомбінантної). Для визначення експресії гена Вах використовували праймери — 5'-САССAGCTCTGAACAGATCATGA-3' та 5'-ТСAGCCCATCTTCTCCAGATGGT-3' [8], продукт ампліфікації становив 541 п.н. 35 циклів ампліфікації



**Рисунок 1.** Уміст норадреналіну (а) та рівень експресії гена Вах (б) у структурах головного мозку щурів (ЛК — кора лівої півкулі, ПК — кора правої півкулі, Гт — гіпоталамус, Гк — гіпокамп, СМ — середній мозок) після тЧМТ та трансплантації ФНТ: 1 — контрольні тварини, 2 — тварини з тяжкою черепно-мозковою травмою, 3 — тварини з імплантованою після травми фетальною нервовою тканиною; \* —  $P < 0,05$

було здійснено при температурі відпау 55 °С. Візуалізація продуктів ампліфікації проводилася за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі.

Статистичну обробку даних проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

## Результати та їх обговорення

Для відповіді на питання про стан метаболізму норадреналінергічних систем та наявність дегенеративних процесів у тканині мозку після тяжкої черепно-мозкової травми та трансплантації ми досліджували вміст норадреналіну, а також рівень експресії проапоптотичного гена Вах в окремих структурах головного мозку щурів, а саме: у корі лівої (травмованої) та правої півкулі, гіпоталамусі, гіпокампі та середньому мозку. Дослідження проводили в контрольній групі тварин, у групі тварин із тЧМТ через 30 діб після її нанесення та в групі тварин із тЧМТ та тФНТ 18-денних ембріонів щурів (рис. 1). Отримані результати вказують на наявність суттєвих дегенеративних процесів у функціональних структурах головного мозку експериментальних тварин через один місяць після травмування.

Так, у місці удару — лівій корі через 30 діб після тЧМТ різко (у 2,5 раза) знижений рівень норадреналіну і, навпаки, підвищений (у 2,3 раза порівняно з групою контрольних тварин) рівень експресії гена Вах, який є

показником активності апоптичних процесів. У тварин, яким після тЧМТ була імплантована ФНТ сенсомоторної кори, у тканині кори лівої півкулі відмічається уповільнення активності процесів апоптозу, а також підвищення вмісту норадреналіну (на 11 %), але повного повернення цих показників до їх рівня в інтактних тварин не відбувається. Динаміка вмісту норадреналіну в корі правої півкулі відрізняється вірогідним його підйомом як у групі травмованих тварин, так і в групі тварин з тЧМТ та тФНТ (189 та 192 % відповідно). Наведені дані можуть вказувати на розвиток компенсаторних процесів у протилежній щодо зони травмування півкулі. При цьому рівень експресії проапоптичного гена Вах у корі правої півкулі тварин, що підлягали дії тЧМТ, все ж значно перевищував рівень даного показника в інтактних тварин, хоча ця різниця була дещо менш виражена порівняно з корою травмованої півкулі. Трансплантація фетальної нервової тканини сприяла нормалізації рівня експресії Вах у цьому відділі мозку.

Отже, результати досліджень дегенеративних процесів у корі головного мозку шурів у післятравматичному періоді свідчать про формування іншої нейрохімічної організації інтегративних взаємодій, характерною рисою якої є підвищення міжпівкульної асиметрії, що, як відомо, властиве мозку з підвищеною судомною готовністю. Є дослідження, що вказують на пряму кореляцію вираженості міжпівкульної асиметрії з норадреналіном та рівнем судомної готовності [9]. Трансплантація ФНТ призводить до зсуву цього негативного співвідношення.

Результати досліджень вмісту норадреналіну та рівня експресії Вах у гіпокампі — структурі лімбічної системи мозку, що також відіграє одну з найважливіших ролей у формуванні епілептиформних станів після ЧМТ, свідчать, що через 30 діб після травми у тварин з тЧМТ та тЧМТ + тФНТ рівень норадреналіну в гіпокампі близький до контрольного значення, рівень експресії проапоптичного гена Вах в гіпокампі шурів, яким була нанесена тЧМТ, перевищував цей показник в контрольній групі тварин на 53 %. Ці зміни є менш вираженими порівняно з іншими досліджуваними структурами мозку. Трансплантація ФНТ призводить до нормалізації в гіпокампі як вмісту норадреналіну, так і рівня експресії гена Вах.

Секреторна діяльність гіпоталамуса регулюється різними нейромедіаторними системами мозку; норадреналін, як вважають, має більш виражену стимулюючу дію. З отриманих нами даних видно, що через 30 діб після травми вміст норадреналіну в цій структурі у травмованих тварин був у 1,4 раза нижчим, ніж у контрольних. Імовірно, що однією з причин недостатності нейромедіаторного забезпечення норадреналінергічної системи в гіпоталамусі при тЧМТ є досить висока інтенсивність апоптичних процесів у цій структурі мозку навіть через 30 діб після її нанесення, про що свідчить рівень експресії гена Вах (в 2 рази вище порівняно з контрольною групою). Трансплантація фетальної нервової тканини сприяла поверненню вмісту норадреналіну до рівня

контрольних значень. Експресія гена Вах у гіпоталамусі тварин, яким була трансплантована ФНТ, також значно знизилася, але все ще перевищувала показник контрольної групи. Отже, тяжка ЧМТ призводить до зниження вмісту норадреналіну в гіпоталамусі тварин навіть через один місяць після її нанесення, що є вагомою причиною порушення адекватного реагування функціональних систем у відповідь на зовнішній вплив і може призводити до розвитку віддалених наслідків, що проявляються у вигляді ендокринних розладів, а трансплантація ФНТ є перспективним методом запобігання таким процесам.

Післятравматичні зміни, як свідчать клінічні дані, у ряді випадків можуть провокувати паркінсонічні явища. Особлива роль в організації рухової функції належить нігостріарному дофамінергічному шляху; норадреналіну відводиться роль фактора, що справляє модулюючий вплив на активність дофамінергічних нейронів на рівні середнього мозку [10]. За нашими даними, вміст норадреналіну та рівень експресії гена Вах в середньому мозку тварин через 30 діб після перенесеної тЧМТ не відрізнявся від інтактних шурів, а у тварин з тЧМТ та тФНТ показник вмісту норадреналіну був навіть на 35 % вищий за контрольний. Отже, віддалені наслідки ЧМТ у вигляді порушень рухових функцій, ймовірно, спричиняються розладами функціонування інших нейромедіаторних систем мозку або розладами їх інтеграції.

Таким чином, отримані дані свідчать про високу активність процесів апоптозу у більшості досліджених структур головного мозку та порушення нейромедіаторного, зокрема норадреналінергічного, забезпечення їх функціонування (особливо кори травмованої півкулі та гіпоталамусу) у віддаленому післятравматичному періоді. Введення фетальної нервової тканини сприяє гальмуванню процесів апоптозу та відновленню вмісту норадреналіну в різних функціональних структурах.

## Висновки

Тяжка ЧМТ призводить до зниження вмісту норадреналіну у функціональних структурах головного мозку шурів, а саме у корі лівої (травмованої) півкулі та гіпоталамусі через 30 діб після травми. У корі контралатеральної правої півкулі мозку спостерігається статистично вірогідне підвищення вмісту норадреналіну.

Рівень експресії проапоптичного гена Вах у головному мозку шурів через 30 діб після тЧМТ перевищує контрольні значення у більшості досліджених структур головного мозку: у корі лівої (травмованої) півкулі та гіпоталамусі — більше ніж на 200 %, у гіпокампі та корі правої півкулі мозку — на 153 та 190 % відповідно.

Трансплантація алогенної фетальної нервової тканини сприяє підтримці вмісту норадреналіну у гіпоталамусі травмованих тварин в межах, близьких до контрольних, та його підвищенню, але не повному відновленню в лівій (травмованій) півкулі головного мозку, а також гальмуванню рівня експресії Вах у досліджених структурах головного мозку.

## Список литературы

1. Patt S. *Neuropathological sequelae of traumatic injury in the brain. An overview* / S. Patt, N. Brodhun // *Exp. Toxicol. Pathol.* — 1999. — Vol. 51, № 2. — P. 119-123.
2. Отелин В.А. *Функциональная морфология медиаторных систем головного мозга* / Отелин В.А. // *Журн. неврол. и психиатр.* — 1998. — № 1. — С. 54-58.
3. Raghupathi R. *Cell death mechanisms following traumatic brain injury* / R. Raghupathi // *Brain Pathol.* — 2004. — Vol. 14, № 2. — P. 215-222.
4. Politis M. *Brain imaging after neural transplantation* / M. Politis, P. Piccini // *Prog. Brain Res.* — 2010. — № 184. — P. 193-203.
5. Гельфанд В.Б. *Закрытая черепно-мозговая травма* / В.Б. Гельфанд, М.Д. Маламуд, В.Г. Истратов. — Кишинев: Штиинца, 1986. — 278 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.

7. Клеменс М. *Выделение эукариотической матричной РНК (мРНК)* / М. Клеменс // *Транскрипция и трансляция. Методы: пер. с англ.* [редкол.: Б. Хеймс, С. Хиггинс]. — М.: Мир, 1987. — С. 254-275.
8. *Diminished penile expression of vascular endothelial growth factor and its receptors at the insulin-resistant stage of a type II diabetic rat model: a possible cause for erectile dysfunction in diabetes* / S. Jesmin, I. Sakuma, A. Salahldin [et al.] // *J. of Mol. Endocrinology.* — 2003. — № 31. — P. 401-418.
9. Сергиенко Н.Г. *Биогенные амины и возбудимость головного мозга* / Н.Г. Сергиенко, В.И. Грищенко, Г.А. Логинова. — К.: Наукова Думка, 1992. — 147 с.
10. McKeran R.O. *The biochemistry of diseases of the central nervous system* / R.O. McKeran // *Biochemical aspects of human disease* [Ed. R.S. Elkells, A.S. Tavit]. — London — Edinburgh: Oxford, 1983. — P. 435-480.

Отримано 22.10.13 ■

Бараненко Б.А.  
Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова  
НАМН Украины, г. Киев

Baranenko B.O.  
Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov  
of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv,  
Ukraine

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В НОРАДРЕНАЛИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФЕТАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ

**Резюме.** Исследовано содержание норадреналина и уровень экспрессии гена Bax в коре левого и правого полушарий, гипоталамусе, гиппокампе и среднем мозге крыс через 30 дней после экспериментальной тяжелой черепно-мозговой травмы и трансплантации фетальной нервной ткани. Установлено, что тяжелая черепно-мозговая травма приводит к снижению содержания норадреналина в коре травмированного полушария и гипоталамусе, а также к повышению уровня проапоптотического гена Bax во всех исследованных структурах головного мозга, что указывает на наличие деструктивных процессов в мозге животных в отдаленный период после травмы. Трансплантация фетальной нервной ткани экспериментальным крысам с тяжелой черепно-мозговой травмой способствовала нормализации исследованных показателей.

**Ключевые слова:** тяжелая черепно-мозговая травма, трансплантация фетальной нервной ткани, норадреналин, апоптоз.

#### RESEARCH OF DEGENERATIVE PROCESSES IN THE BRAIN NORADRENERGIC SYSTEMS OF RATS WITH SEVERE CRANIOCEREBRAL INJURY AND IMPACT ON THEM OF FETAL TISSUE TRANSPLANTATION

**Summary.** Norepinephrine content and level of Bax gene expression were investigated in the left and right hemisphere cortexes, hypothalamus, hippocampus and mesencephalon of rats in 30 days after an experimental severe craniocerebral injury and fetal nervous tissue transplantation. It is discovered that severe craniocerebral injury causes the decline of norepinephrine content in the damaged hemisphere cortex and hypothalamus and also to increase in the level of proapoptotic Bax gene expression in all investigated brain structures that indicates destructive processes in the brain of animals in a remote period after a trauma. Fetal nervous tissue transplantation to experimental rats with severe craniocerebral injury contributes to the normalizations of investigated indexes.

**Key words:** severe craniocerebral injury, fetal nervous tissue transplantation, norepinephrine, apoptosis.