ФЕНОМЕН «АПОПТОЗА» И ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Мамытова Э.М., Кадыралиев Т.К., Сулайманов М.Ж.

КГМА, НИИ МБ и М при НЦК и Т, НГ МЗ КР, Бишкек, Кыргызстан

Резюме. Нейрональная и глиальная гибель клетки и травматическое повреждение аксонов вносят вклад в общую патофизиологию черепно-мозговой травмы (ЧМТ) как у людей, так и у животных. И в поврежденном мозге пациентов и экспериментальных животных погибающие нервные клетки демонстрируют либо апоптическую, либо некротическую морфологию. Апоптически измененные нейроны были идентифицированы в пределах очага контузии у 6 экспериментальных животных в острый посттравматический период, и в участках мозга, отдаленных от места воздействия на 7 сутки после травмы.
Ключевые слова: экспериментальная черепно-мозговая травма, апоптоз, патоморфология.

APOPTOSIS PHENOMENON AND ITS CHARACTERISTICS AFTER EXPERIMENTAL AND CLINICAL TRAUMATIC HEAD INJURY

Mamytova E.M., Sulaimanov M.G., Kadiraliev T.K.

KSMA, SRI MB and NCC, NH MH KR, Bishkek, Kyrgyzstan

Resume. Several neuronal populations are selectively vulnerable to cell death after traumatic brain injury (TBI) in experimental models and in man. Both necrotic and apoptotic cell death have been described after experimental and clinical TBI. A common feature apoptotic cell death were determined in the injured cortex at 6 rats in the acute posttraumatical period. The cortex ipsilateral and contralateral to the impact site exhibited apoptosis with varying staining intensities in 7 days after injury.
Key words: experimental traumatic brain injury, apoptosis, pathomorphology.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛДЫК БАШ МЭЭ ЖАРАТЫНДАГЫ «АПОПТОЗДУН » ФЕНӨМЕНИ ЖАНА АГА МҮНӨЗДӨМӨ

Мамытова Э.М., Кадыралиев Т.К., Сулаймапов М.Ж.

КММА, Т жана УКБ караштуу ИИИ МБ жана М, КР ССМ УГ, Бишкек шаары

Корутунду. Нейроналдык жана глиалдык клеткалардын ёлъшъ жана травманын тасиринен аксондордун жараттануусу адамдарда да, ошондой эле жаныбарларда да баш мээнин травмасынын (БМТ) патофизиологиясына таасир этет. Оорулулнун жараттанган баш мээси жана эксперименталдык жаныбарлардын өлгөн нерв клеткалары апоптоз, же болбосо некроз түрүндөгү морфологиясы демонстрациаланат. 6 эпсперимент жургъзългён жанабарлардан травманын 1-5-күндөрүндө апаптоз түрүндөгү өзгөргөн нейрондор мээнин козголгон бөлүгүндө идентификациаланган, жана ошондой эле 7- күндө козголгон мээнин көп алыс эмес айланасында байкалган.
Негизги сөздөр: эксперименталдык баш мээ травмасы, апоптоз, патоморфология.

Актуальность. В середине 90-х годов работами A. Rink с соавт. [14] было получено доказательство, что причиной отсроченной гибели нейронов, по крайней мере, на моделях экспериментальной ЧМТ, является апоптоз этих клеток.

Травма мозга может индуцировать смерть клеток по типу апоптоза в участках мозга, отстоящих от очага ушиба на значительном расстоянии [4]. Метод, основанный на анализе фрагментации ДНК — TUNEL, выявил апоптоз на отдалении от очага травматического ушиба мозга пострадавших, переживших травму ЧМТ от 5 до 10 дней [1, 2, 3].

После черепно-мозговой травмы апоптоз нейронов был идентифицирован в сером веществе [9,10], в перифокальной зоне очага ушиба и в клетках-олигодендроцитах белого вещества [5]. ЧМТ у пациентов проявляется в гибели нейронов в коре, гиппокампе, мозжечке и таламусе [12,13,15], и эти паттерны клеточной гибели являются точной копией изменений нейронов у животных с экспериментальной травмой. В неповрежденной клетке апоптоз находится под строгим генетическим контролем. Причиной запуска апоптоза при травме мозга может быть воздействие на геном клетки

нейромедиаторов, медиаторов воспаления, ишемии и т. д. [6, 11].

Механизму апоптоза противостоит антиапоптоз [7], и посттравматическая судьба нейронов может зависеть от их соотношения [8]. Исследуя соотношение экспрессии апоптотических и антиапоптотических белков после экспериментальной травмы головы, A. Wennersten и соавт. [16] показали, что в течение достаточно длительного времени (до 6 сут) остается открытым "окно" для проведения антиапоптотического лечения.

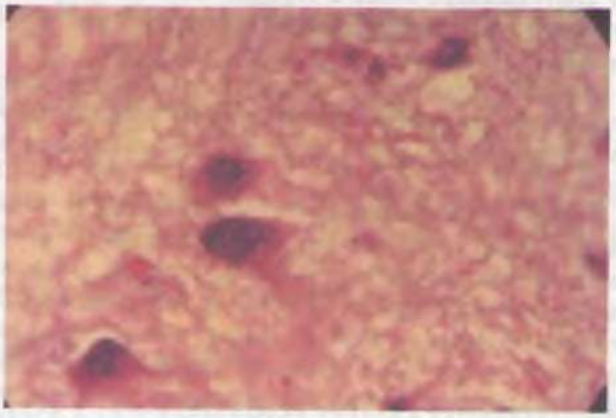
Целью нашего исследования являлось определение пространственных и временных паттернов апоптической и некротической гибели клеток после экспериментальной ЧМТ в зависимости от тяжести ЧМТ, срока с момента получения ЧМТ.

Материалы и методы. Исследованию был подвергнут головной мозг 10 крыс, получивших закрытую дозированную черепно-мозговую травму. Травма наносилась по нефиксированной голове животного в лобно-теменной области по сагиттальной линии ударником оригинальной конструкции, создающим стандартную силу удара, измеряющуюся в кгс. Применялись наконечники различной формы для воспроизведения легкой (1 группа -4) и средне-тяжелой (2 группа – 6) ЧМТ. Во всех случаях наблюдали контузионный очаг в месте приложения удара и у 1/3 животных очаг по типу contre-coup. Для извлечения мозга проводилась трепанация крыши черепа. Кусочки мозга вырезались с таким расчетом, чтобы в один блок попали контузионный очаг и перифокальная зона, а в другой — аналогичный участок из второго, неповрежденного, полушария. Очаг ушиба располагался в лобно-теменной области одного из полушарий, поэтому у всех подопытных крыс и у 5 контрольных (нетравмированных) материал забирался именно из этой области. Забор ткани производили через 24 часа, 7, 14 суток после травмы.

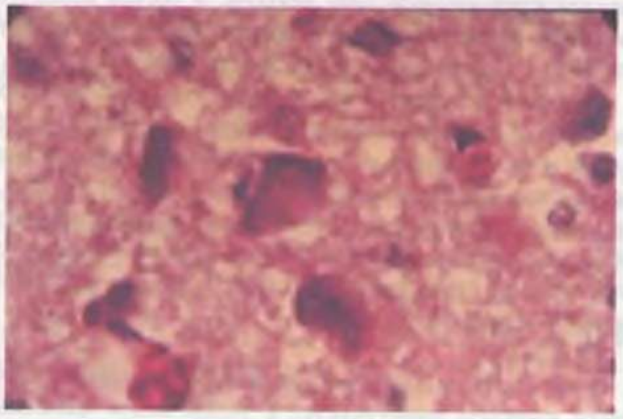
Морфологическая эволюция ткани головного мозга в контузионном очаге, в пери-фокальной зоне и в отдалении от очага прослежена на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, а также на полутонких срезах, окрашенных толуидин-синим. Ткань фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили через парафин.

Результаты и обсуждения. На гистологических срезах толщиной 4—5мкм, окрашенных гематоксилином и эозином, апоптоз распознается уже при малом увеличении по уплотнению и уменьшению в размерах клетки, ее изоляции от окружающей ткани путем окружения светлым ободком, характерному перераспределению хроматина. Формирование апоптозных телец поэтапно прослеживается на полутонких срезах и при окрашивании гематоксилин-эозином.

Ни одна из мышей 1 группы (наконечник №1) не показала перелом черепа или кровоизлияние. Все животные пришли в сознание в течение 2 минут и вели себя обычно. Повреждение нейрональных клеток было ограниченным, главным образом, слоем 1-3 теменной коры на стороне удара. Апоптически измененные клетки не были найдены . Все мыши из 2 группы (наконечник №2) имели локальный перелом черепа и подпаутинообразное кровоизлияние. Они находились в бессознательном состоянии (> 5 минут) и проявляли сниженную моторную активность. Пять животных пережили 24 часа. Гистологическая экспертиза показала двустороннее вовлечение нейронов теменной коры, гиппокампа и таламуса. Апоптоз клеток был замечен в зоне пенумбры и в зоне гиппокампа на стороне приложения травмы на 7 сутки с момента травмы.



Световая микроскопия коры мозга. Пирамидные клетки коры головного мозга. Отчетливо видны ядро, ядрышки, цитоплазма однородна. В нейропиле отмечается отек и разволокнение вещества мозга. Увеличение *1100. Окраска гематоксилином-эозином.



Световая микроскопия коры мозга. Пирамидные клетки коры головного мозга. Отмечается эозинофилия нейронов. Отсутствуют ядро нейронов и ядрышки. В нейропиле отмечается гидропическая дистрофия. Увеличение *1100. Окраска гематоксилином-эозином

Эти результаты подтверждают, что апоптоз присутствует в ткани мозга животных после травмы средней и тяжелой степени, но не после легкой травмы.

Экспериментальная травма средне-тяжелой степени приводит как к некрозу, так и апоптозу, хотя обширность некроза была больше апоптоза по отношению общему количеству умирающих клеток.

Травма черепа и головного мозга сопровождалась чаще всего образованием локального контузионного очага, нарушением кровообращения в перифокальной зоне и в отдалении от очага, а также выраженными изменениями церебрального метаболизма. Динамика острого периода закрытой черепно-мозговой травмы позволила выявить определенную фазность патоморфологической ткани мозга и условно обозначить эти периоды как стадии мобилизации, резистентности, восстановления.

В стадии мобилизации — в 1-й час после травмы - морфологические изменения были представлены преимущественно спазмом мелких сосудов в веществе мозга - в отдалении от очага ушиба и в перифокальной зоне, в очаге ушиба — ректическими кровоизлияниями. Вне контузиокного очага в нервных клетках отмечался частичный хроматолиз нисслевской субстанции и начальные стадии гидропических изменений.

В перифокальной зоне нарастало количество ишемических и сморщенных нейронов. В контузионном очаге ткань мозга была размозжена и имбибирована кровью.

В стадии резистентности (продолжительность около 2 нед) в ткани мозга вне очага ушиба уже в 1-е сутки спазм сосудов сменялся стойкой гиперемией. В последующие дни нарастало количество кровоизлияний, различающихся между собой по генезу: диапедезные, ангионевротические (кольцевидные), ангионекротические (сосудистая дистония, плазматические озера). В нервных клетках нарастали гидропические изменения; максимальная степень отека мозга отмечалась на 7-е сутки наблюдения. К этому времени преимущественно периваскулярный и пе-рифокальный астроцитарный глиоз был уже отчетливо выражен. К концу 7-х суток формировался клиновидный очаг некроза, в состав которого, кроме первичного некроза, входила ткань перифокальной зоны — преимущественно внутренние ее слои.

В стадии восстановления к 14-м суткам после травмы намечается тенденция к нормализации кровообращения и метаболизма в ткани головного мозга. Сохраняется венозная гиперемия, но свежих кровоизлияний и очагов размягчения уже нет. Кровоизлияния подвергаются резорбции, а в некротических очагах идет активный процесс организации с образованием глиально-мезенхимального рубца.

Выводы

1. В световом микроскопе морфологические признаки апоптоза присутствует в ткани мозга животных после травмы средней и тяжелой степени и фиксируются в поздние сроки (через 7 суток и более).

2. Экспериментальная травма средне-тяжелой степени приводит как к некрозу, так и апоптозу, хотя обширность некроза больше апоптоза по отношению общему количеству умирающих клеток.

3. Характер морфологических изменений в ткани головного мозга в остром периоде средне-тяжелой черепно-мозговой травмы показал, что в течение достаточно длительного времени (до 7 сут) остается открытым "окно" для проведения антиапоптотического (нейропротекторного) лечения.

4. Сопоставление морфологических изменений в ткани головного мозга в остром периоде среднетяжелой черепно-мозговой травмы позволяет выделить три стадии патологического процесса: мобилизации, резистентности и восстановления.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams J.H., Graham D.J., Gennarelli T.A. Head injury in man and experimental animals-neuropathology. Acta Neurochirurg. 1983: 32 (Suppl):15-30.

2. Adams J.H., Graham D.I., Gennarelli T.A. Primary brain damage in non-missile head injury. In: Mechanism of secondary brain damage (Eds. A. Baethman et al.) — N.Y.: Plenum, 1986. — p.l —13.

3. Bayly PV., Dikranian KT., Black EE., et al. – Spatiotemporal evolutuin of apoptic neurodegeneration following traumatic injury to the developing rat brain. - J. Brain Res., 2006, Aug 30; 1107(1): 70-81. Epub 2006 Jul 5.

4. Chopp M., Chan P., Chung Y. - DNA damage and repair in central nervous system injury. — Stroke, 1996, 27,3: 363-369.

5. Clark R., Kochanek P., Dixon C, et al. — Early neuropathoiogic effects of mild or moderate hypoxemia after controlled cortical impact injury in rats. — J. Neurotrauma, 1997, 14,4: 179-190.

6. Dressler J., Hanisch U., Kuhlisch E., et al. – Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. – Int. J. Legal Med., 2006, Nov 15;

7. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. — Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. — J. Cell Biol - 1992, 119: 493-501.

8. Gennarelli T.A., Adams J.H., Graham D.I. Diffuse axonal injury — a new conceptual aproach to an old problem // Mechanism of secondary brain damage (Eds. A.Baethman et al.) - N.Y.: Plenum, 1986. p.15-28.

9. Hang CH., Shi JX., Sun BW., et al. – Apoptic and functional changes of dipeptide transporter (PepT1) in the rat small intestine after traumatic brain injury.- J. Brain Res., 2007, Jan 13; 137(1): 53-60. Epub 2006 Nov 1.

10. Kotapka M., Graham D., Adams J., et al.— Hipocampal damage in fatal non-missile human head injury: frequency and distribution. — Acta Neuropathol (Berl), 1992, 83: 530

Kotapka M., Graham D., Adams J.et al.— Hippocampal pathology in human fatal head injury without high intracrania pressure —. J. Neurotrauma, 1994, 11: 317—324.

11. Linnik M., Zobrist R., Hatfield M. — Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. — Stroke, 1993, 608: 21—26.

12. Marshall L.F., Marshall S.B., KJauber M.R. et al.: A new classification of head injury based on computerized tomography. J. of neurosurgery, V. 75: 1991: S14—S20.

13. Matsumoto K., Veda S., Hashimoto T. — Ischemic neuronal injury in rat hippocampus following transient forebrain ischemia: evolution using in vivo microdialysis. — Brain Res., 1991, 543, 236-42.

14. Rink A., Fung K., Trojanowski J. — Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. - Amer. J. Pathology, 1995, 147, 6: 1575-1584.

15. Sharov V., Jiang N., Zaloga C., et al. — Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. — Amer. J. Pathol., 1995, 146, 5: 1045-1051.

16. A. Wennersten., Chen X., Pierce J. et al. - - Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. - J. Neurotrauma, 1997, 14,10: 715-727.