

DOI: 10.15690/vramn568

Р.Ш. Закиров¹, Е.Г. Сорокина¹, О.В. Карасёва², Ж.Б. Семёнова^{1,2},
С.В. Петричук¹, Л.М. Рошаль^{1,2}, В.Г. Пинелис¹

¹ Научный центр здоровья детей Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии ДЗМ,
Москва, Российская Федерация

Функциональное состояние митохондрий лимфоцитов периферической крови при черепно-мозговой травме у детей

Обоснование. Известна важная роль митохондрий в механизмах повреждения и гибели клеток мозга при черепно-мозговой травме (ЧМТ). Однако вопросы взаимоотношений между тяжестью повреждения мозга при ЧМТ и митохондриальной дисфункцией окончательно не решены. **Цель исследования:** определить активность NADH- и сукцинатдегидрогеназ — ключевых ферментов окислительного фосфорилирования митохондрий; содержание аденозинтрифосфата в лимфоцитах при ЧМТ; уровень NO_x и 3-нитротирозина в периферической крови у детей, перенесших травмы различной степени тяжести и имеющих разные исходы ЧМТ. **Материалы и методы:** определение указанных показателей проводилось в динамике до одного месяца, а в отдельных случаях — вплоть до гибели больных. Тяжесть ЧМТ оценивали в баллах по шкале комы Глазго, исход ЧМТ — по шкале исходов Глазго. Детей с ЧМТ на основании клинической оценки разделили на 3 группы — с легкой, тяжелой и с тяжелой ЧМТ и летальным исходом. **Результаты:** исследования показали, что активность дегидрогеназ достоверно снижалась только у больных с тяжелой ЧМТ и неблагоприятным исходом. Наибольшее снижение этих показателей выявлено у больных с летальным исходом. Обнаружена прямая корреляционная зависимость между показателями активности дегидрогеназ и содержанием аденозинтрифосфата в лимфоцитах ($r = 0,97$, $p = 0,005$). Содержание метаболитов NO_x у детей с тяжелой ЧМТ на порядок превышало их уровень у здоровых детей и больных с легкой ЧМТ. Уровень 3-нитротирозина в плазме крови был тем выше, чем тяжелее была ЧМТ. **Заключение.** Обнаруженные при ЧМТ у детей митохондриальная дисфункция, нарушение мозгового энергетического обмена и окислительный стресс могут приводить к повреждению и гибели клеток мозга, а также быть мишенями для адекватной терапии ЧМТ.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, дети, нейрон, лимфоцит, митохондрии, аденозинтрифосфат, митохондриальные дегидрогеназы, оксид азота, пероксинитрит, 3-нитротирозин.

(Для цитирования: Закиров Р.Ш., Сорокина Е.Г., Карасёва О.В., Семёнова Ж.Б., Петричук С.В., Рошаль Л.М., Пинелис В.Г. Функциональное состояние митохондрий лимфоцитов периферической крови при черепно-мозговой травме у детей. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (6): 710–717. Doi: 10.15690/vramn568)

R.S. Zakirov¹, E.G. Sorokina¹, O.V. Karaseva², Zh.B. Semenova^{1,2}, S.V. Petrichuk¹,
L.M. Roshal^{1,2}, V.G. Pinelis¹

¹ Scientific Centre of Children Health, Moscow, Russian Federation

² Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology, Moscow, Russian Federation

Peripheral Blood Lymphocytes Mitochondrial Function in Children with Traumatic Brain Injury

Background: It is known that mitochondria play an important role in the mechanisms of brain cells damage and death following traumatic brain injury (TBI). However, the relationship between the severity of brain damage following TBI and mitochondrial dysfunction are not well defined. **Aim:** to study activities of NADH- and succinate dehydrogenases, a key enzyme of mitochondrial oxidative phosphorylation in children with TBI of varying severity and different outcomes; to detect ATP content in lymphocytes; the level of NO_x and 3-nitrotyrosine in serum and plasma. **Methods:** all parameters were determined in the dynamics of one month following TBI, and in some cases up to the death of patients. The severity of TBI was scored by Glasgow Coma Scale (GCS), the outcome of TBI — Glasgow Outcome Scale (GOS). Based on the clinical examination children with TBI were divided into 3 groups: (1) mild TBI; (2) severe TBI and (3) severe TBI with fatal outcome. **Results:** we found that activity of dehydrogenases is significantly reduced only in patients with the poor neurologic outcome. The greatest decrease in these parameters was observed in patients with severe traumatic brain injury and fatal outcome. A direct correlation was found between the indices of dehydrogenases activity and ATP content in lymphocytes ($r = 0.97$, $p = 0.005$). The levels of NO_x metabolites and 3-nitrotyrosine were significantly increased in children with severe TBI. **Conclusion:** obtained results suggest that mitochondrial dysfunction, impaired cerebral energy metabolism and oxidative stress contribute to cell death in the brain and thus represent therapeutic targets for the treatment of TBI.

Keys words: traumatic brain injury, children, neuron, lymphocyte, mitochondria, ATP, mitochondrial dehydrogenase, nitric oxide, peroxyne, 3-nitrotyrosine.

(For citation: Zakirov R.S., Sorokina E.G., Karaseva O.V., Semenova Zh.B., Petrichuk S.V., Roshal L.M., Pinelis V.G. Peripheral Blood Lymphocytes Mitochondrial Function in Children with Traumatic Brain Injury. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (6): 710–717. Doi: 10.15690/vramn568)

Обоснование

Черепно-мозговая травма у детей (ЧМТ) — важная проблема здравоохранения, ежегодно затрагивающая жизнь многих тысяч пострадавших, для которых характерны как высокие цифры летальности, так и высокий процент инвалидности, что требует длительного лечения и реабилитации [1–3]. Для ЧМТ характерно первичное повреждение, развивающееся непосредственно в ответ на воздействие механических факторов, которое в течение ближайших минут и часов запускает вторичные множественные деструктивные процессы в нейронах и глиальных клетках, в значительной степени обусловленные развитием гипоксии и усугубляющие тяжесть первичного повреждения мозга [4]. В результате формируется порочный круг, который может стать определяющим в исходе ЧМТ. Механизмы, по которым развивается гипоксическое повреждение мозга, реализуются в результате сложного каскада патофизиологических процессов, включающих, в частности, глутаматную эксайтотоксичность, кальциевую перегрузку нейронов, митохондриальную дисфункцию, избыточную генерацию активных форм кислорода (АФК) и оксида азота (NO_x), конечным исходом которых является гибель клеток путем апоптоза или некроза [5, 6]. Имеются данные, что как при экспериментальных, так и при клинических формах ЧМТ, в том числе у детей, митохондрии повреждаются очень быстро — в течение минут или часов от получения травмы [7–9]. При электронной микроскопии биоптатов мозга больных с тяжелой ЧМТ были обнаружены отек и расширение крист митохондрий, а также потеря целостности их мембран [10]. Последствиями митохондриальной дисфункции при ЧМТ являются оксидативный стресс, нарушение кальциевого гомеостаза, гибель нейронов, метаболические нарушения, выражающиеся, прежде всего, снижением содержания аденозинтрифосфата (АТФ). Имеются данные, что при характерной для ЧМТ гипоксии мозга в митохондриях происходят нарушение процессов сопряжения окисления и синтеза АТФ, повышенное образование в результате этого АФК. Важную роль в процессах окислительного фосфорилирования играют ферменты дыхательной цепи митохондрий, NADH-дегидрогеназа (NADH-Д) и сукцинатдегидрогеназа (СДГ) [11].

Однако связь между тяжестью повреждений мозга при ЧМТ и митохондриальной дисфункцией полностью не установлена.

Цель настоящего исследования состояла в определении активности NADH- и сукцинатдегидрогеназ — ключевых ферментов окислительного фосфорилирования митохондрий; содержания АТФ в лимфоцитах при ЧМТ, а также

изменения уровня NO_x и 3-нитротирозина в периферической крови больных с ЧМТ.

Методы

Дизайн исследования

Проведено неконтролируемое исследование с прерванным временным рядом.

Критерии соответствия

В исследование включены дети с ЧМТ в возрасте от 8 мес до 17 лет. Для объективной оценки тяжести повреждения в работе использовались шкала тяжести травмы (Injury Severity Score, ISS), шкала комы Глазго (ШКГ), а также шкала исходов Глазго (ШИГ). На основании клинической характеристики тяжести больных и в соответствии со шкалами ШКГ и ШИГ больных детей разделили на 3 группы:

- в 1-ю вошел 71 ребенок с легким течением ЧМТ (по шкале ШКГ 14–10, а по шкале ШИГ 5–4);
- во 2-ю — 54 пациента с тяжелым течением (по шкале ШКГ 9–3, а по шкале ШИГ 3–2);
- в 3-ю — 5 больных с летальным исходом (ШИГ 1).

Условия и сроки проведения

Анализировали результаты обследования детей с ЧМТ, госпитализированных в НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы в период с 2012 по 2014 г.

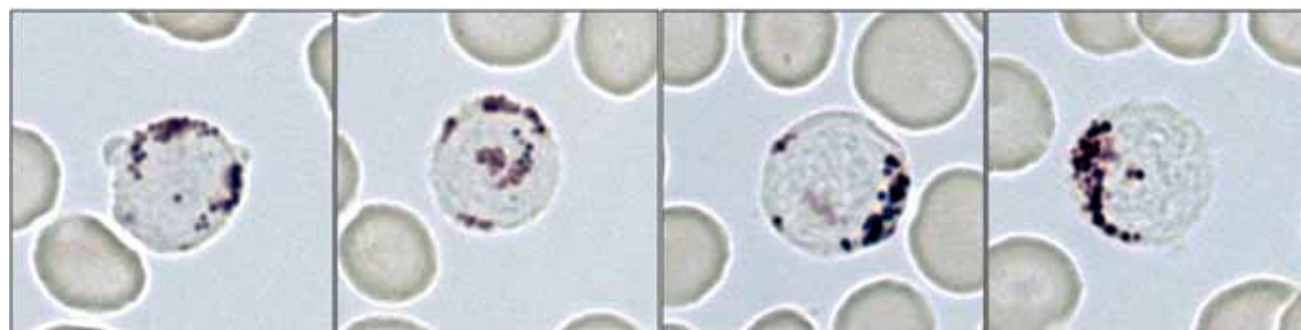
Лабораторное обследование проводилось в динамике ЧМТ от 2 до 7 раз в зависимости от длительности пребывания ребенка в отделении интенсивной терапии. В качестве декретированных сроков лабораторного обследования были выбраны 1–3-и, 4–7-е сут; 1, 2, 3-я нед и 1 мес с момента получения травмы.

Исходы исследования

У 67 пациентов определялась активность митохондриальных дегидрогеназ (NADH-Д, СДГ) в лимфоцитах периферической крови методом количественного цитохимического анализа, основанного на восстановлении р-нитротетразолия фиолетового, выступающего в качестве акцептора протонных пар и электронов от окисляемых субстратов, что обуславливало образование нерастворимых в воде гранул диформаза (рис. 1) [12].

Методы регистрации исходов

Анализ проводился с помощью комплекса аппаратно-программной визуализации морфологических



NADH-дегидрогеназа (EC 1.6.5.1)

Сукцинатдегидрогеназа (EC 1.3.5.1)

Рис. 1. Активность митохондриальных дегидрогеназ, определяемая по интенсивности образования гранул диформаза (окрашенные гранулы) в цитохимической реакции, в лимфоцитах периферической крови на слайдах (оптическое увеличение: $\times 75,6$, $\times 2$; водная иммерсия)

препаратов на основании регистрации оптических и морфологических показателей «ВидеоТест Морфология 5.2» (ООО «ВидеоТест», Россия) методом компьютерной цитоморфоденситометрии, что позволяло оценить геометрические (площадь очагов) и оптические характеристики (интегральная оптическая плотность) гранул продукта ферментативной реакции. Полученные в результате анализа изображений показатели ферментативной реакции как среднее по всем обработанным клеткам в полученном образце использовали в качестве параметров, характеризующих уровень активности NADH-Д и СДГ.

Содержание АТФ определялось в лимфоцитах детей с ЧМТ (n =15) различной степени тяжести. Выделение лимфоцитов осуществлялось в градиенте фиколл-гипак плотностью 1,077 по стандартной методике. Экстракцию АТФ проводили в течение 10 мин на льду с помощью 2% трихлоруксусной кислоты с 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты с последующей нейтрализацией Tris-КОН. Определение уровня АТФ проводили в трис-ацетатном буфере на люминометре Lucy-1 (Anthos-Labtec GmbH, Австрия) с помощью люциферин-люциферазного теста (Promega, США). Концентрацию АТФ выражали в нмоль/мг белка для лимфоцитов. Концентрацию белка в лимфоцитах определяли модифицированным методом Бредфорда с помощью наборов фирмы Fluka (Швейцария).

Содержание NO_x оценивали по изменению содержания его метаболитов — нитритов и нитратов в освобожденной от белка сыворотке крови с помощью набора реактивов компании Calbiochem (США). Метод основан на переводе нитратов в нитриты с помощью нитратредуктазы и определении нитритов по Гриссу (по протоколу фирмы-разработчика). Количественно суммарное содержание нитритов и нитратов оценивали, измеряя оптическую плотность при λ= 530 нм. Полученные значения выражены в мкМ/л сыворотки крови.

Уровень 3-нитротирозина в плазме крови детей с ЧМТ (n=89) определяли иммуноферментным методом с помощью наборов фирмы Nuncult Biotech (США).

Этическая экспертиза

Исследование было одобрено независимым Локальным этическим комитетом Научного центра здоровья детей. От всех родителей детей было получено информированное письменное согласие на участие в исследовании.

Таблица. Клиническая характеристика больных, включенных в исследование

Параметры	Группа с легким течением ЧМТ (1) n =71	Группа с тяжелым течением ЧМТ (2) n =54	Группа с тяжелым течением и летальным исходом (3) n =5	Группа сравнения (4) n =27
Возраст, лет	6 (3–11)	9,5 (7–13)	7 (3–14)	7 (4–14)
Шкала комы Глазго на момент травмы, Me (25–75%)	11 (10–14)	6,5 (3–9)	3,5 (3–5)	-
Шкала ISS (AIS-ЧМТ: 1–5 баллов), %	(1) — 6,25; (2–3) — 12,5; (4–5) — 81,25	(4–5) — 100	(4–5) — 100	-
Шкала исходов Глазго	4–5	3–2	1	-
Изолированная ЧМТ, %	32	34	0	-
Сочетанная травма с ЧМТ в качестве доминирующего повреждения, %	68	66	100	-
Открытая ЧМТ, %	45	66	60	-

Примечание. ЧМТ — черепно-мозговая травма.

Статистический анализ

Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с оценкой их достоверности и результатов корреляционного анализа с помощью компьютерных программ MS Excel 2007 (Microsoft corp., США), Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). Результаты статистического анализа представлены в виде медианы (Me), интерквартильного размаха (IQR: 25–75%, Min-Max: минимум-максимум) или величины средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для проверки статистической гипотезы различий для независимых выборок использовали непараметрические методы: критерий Манна–Уитни — для двух выборок, ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса и медианный тест — для нескольких выборок. Также в работе использовался корреляционный анализ методом множественной пошаговой регрессии.

Результаты

Участники исследования

В ходе работы было обследовано 130 детей с ЧМТ разной степени тяжести и исходов. Клиническая характеристика детей с ЧМТ представлена в табл. Полученные данные сравнивали с показателями 27 условно здоровых детей аналогичного возраста (группа сравнения).

Основные результаты исследования

У детей с легким течением ЧМТ и восстановлением когнитивных функций активность NADH-Д в 1–3-и сут незначительно отличалась от нормативных значений (рис. 2 А). Начиная с 3–7-х сут отмечается статистически значимое снижение активности фермента ($p = 0,016$). В дальнейшем, начиная со 2-й нед посттравматического периода, наблюдалось постепенное увеличение активности фермента. Последнее можно рассматривать как результат постепенного восстановления клеточных функций у этой категории больных, которое направлено на обеспечение субстратами цикла трикарбоновых кислот в митохондриях и сопряжения окислительного фосфорилирования с синтезом АТФ. Высокая активность фермента сохраняется в течение первого месяца ЧМТ у детей с благоприятным исходом. В клинической симптоматике у них отмечалась стойкая положительная динамика с эффективным восстановлением функций мозга. Напротив, у детей с неблагоприятным исходом (тяжелая ЧМТ) начиная с

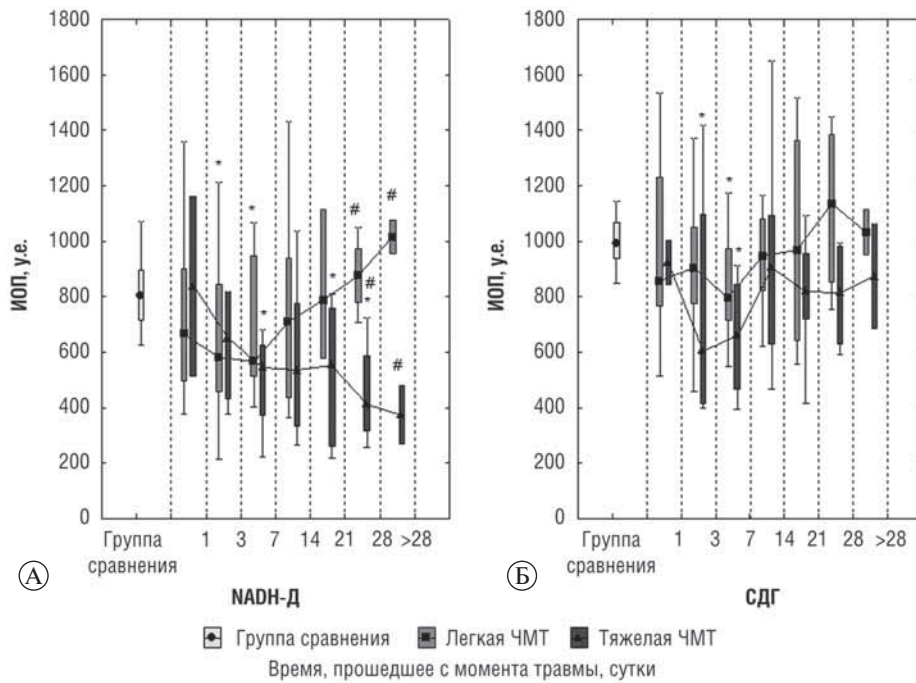


Рис. 2. Динамика интегральной оптической плотности очагов ферментативной реакции NADH-D (А) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (Б) лимфоцитов периферической крови у детей с легкой (ЛЧМТ; n=51, ШИГ 4–5) и тяжелой черепно-мозговой травмой (ТЧМТ; n=11, ШИГ 2–3)

713

Примечание. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха (25–75%); * — $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой детей; # — $p < 0,05$ между группами пациентов; ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса/медианный тест. ИОП — интегральная оптическая плотность, ШИГ — шкала исходов Глазго.

7-х сут наблюдалось уменьшение активности NADH-D, которое сохранялось в дальнейшем на протяжении всего посттравматического периода (см. рис. 2 А).

Несколько иная динамика наблюдалась в отношении изменений активности СДГ (рис. 2 Б). У детей с благоприятным течением ЧМТ обнаружено достоверное

снижение активности к 7-м сут после травмы ($p=0,011$). В дальнейшем, по мере выздоровления, активность СДГ повышалась и находилась в пределах величин, полученных у условно здоровых детей. У детей с неблагоприятным течением ЧМТ на 3–7-е сут после травмы выявлено статистически значимое снижение активности СДГ,

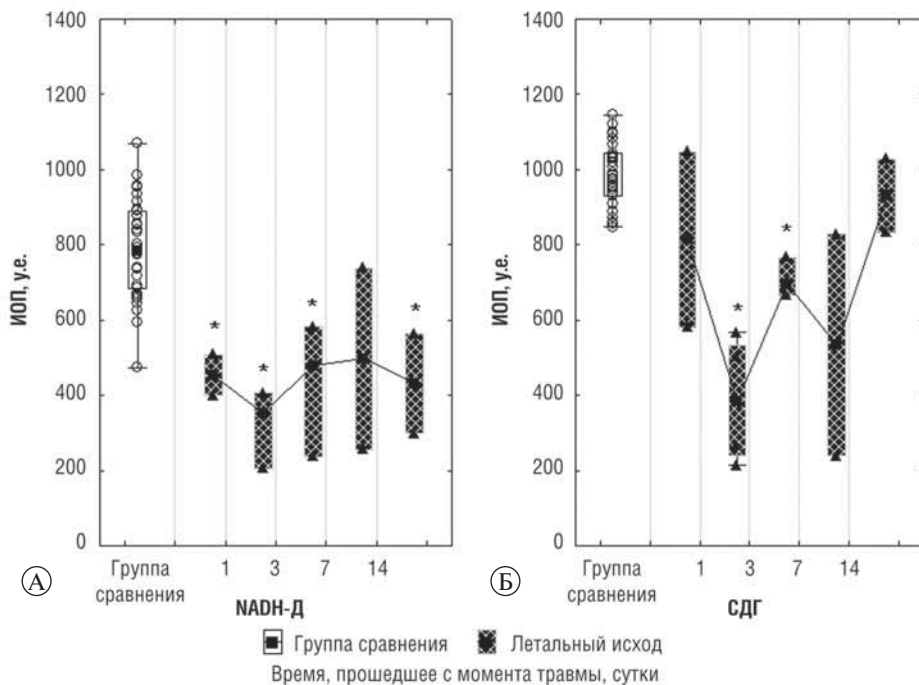
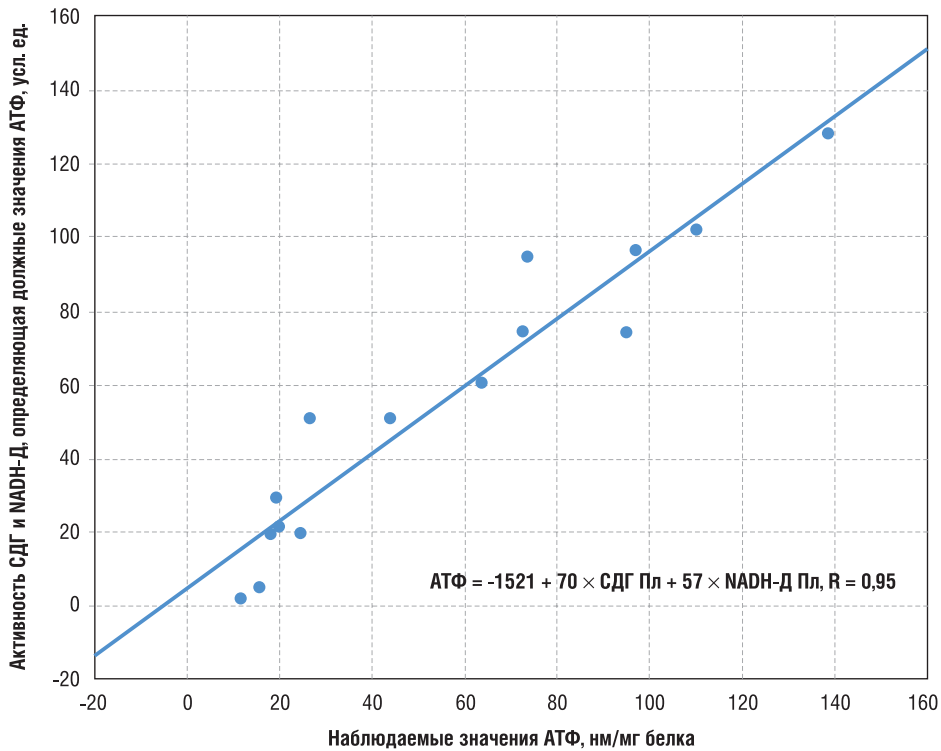


Рис. 3. Динамика интегральной оптической плотности очагов ферментативной реакции NADH-D (А) и СДГ (Б) лимфоцитов периферической крови при ЧМТ у детей с летальным исходом (n=5, ШИГ 0)

Примечание. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха (25–75%). * — $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой детей; критерий Манна–Уитни. ИОП — интегральная оптическая плотность, ЧМТ — черепно-мозговая травма, СДГ — сукцинатдегидрогеназа, ШИГ — шкала исходов Глазго.



714

Рис. 4. Корреляционная зависимость между уровнем АТФ и активностью дегидрогеназ (NADH-Д и сукцинатдегидрогеназы, СДГ, определяемая по суммарной площади очагов ферментативной реакции) лимфоцитов у детей с ЧМТ. Использовался метод множественной пошаговой регрессии (коэффициент корреляции R = 0,95, коэффициент определения 90%)

что совпадает с клиническим ухудшением (нарастание гемодинамических нарушений, появление синдрома системного воспалительного ответа). В дальнейшем значения активности СДГ повышались и достоверно не отличались от уровня группы сравнения, что, вероятно, связано с включением в схему лечения метаболических препаратов, таргетно воздействующих на СДГ.

Несомненный интерес представляют полученные данные об изменении активности митохондриальных ферментов у больных с тяжелой ЧМТ и летальным исходом. Как видно на рис. 3 А, у этих больных (n = 5) актив-

ность NADH-Д была достоверно снижена в течение всего периода наблюдения (2 и более недель), несмотря на проведенную интенсивную метаболическую терапию с момента поступления больных в отделение реанимации. Изменения активности СДГ были менее выражены, а у некоторых пациентов накануне гибели превышали исходный уровень, что обусловлено постоянной инфузией препаратов солей янтарной кислоты (рис. 3 Б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что NADH-Д и СДГ дыхательной цепи митохондрий включаются в патологический процесс, начиная с

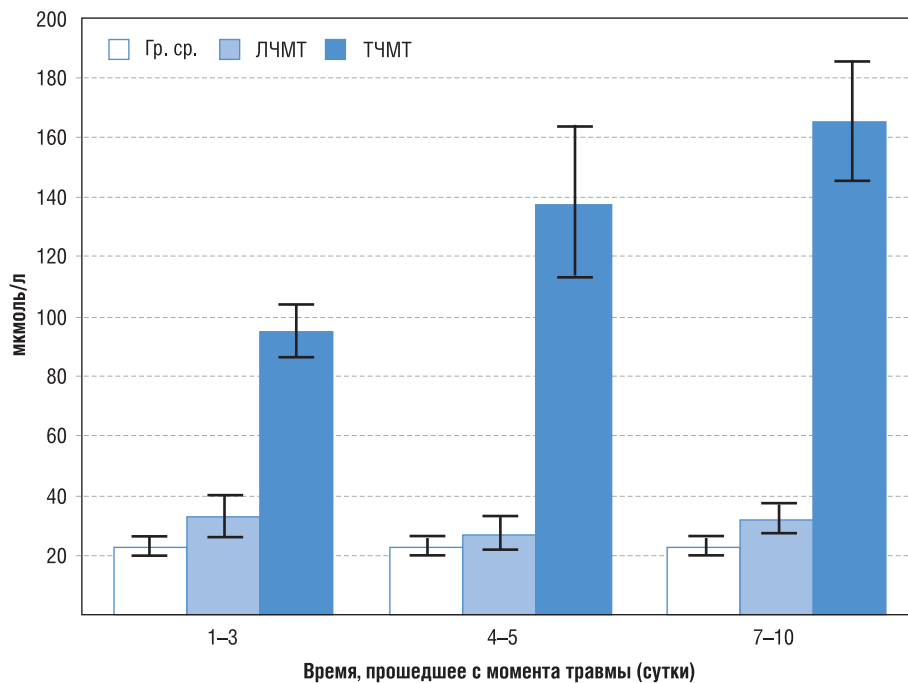


Рис. 5. Уровень оксида азота (NO_x) в сыворотке крови у детей с легкой и тяжелой черепно-мозговой травмой (ЛЧМТ, ТЧМТ). Данные представлены в виде M ± m

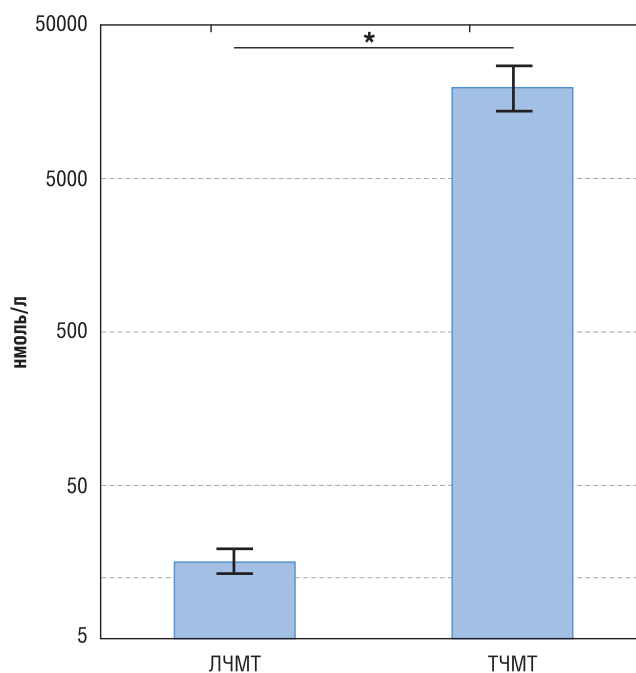


Рис. 6. Концентрация 3-нитротирозина в плазме крови у пациентов с легкой и тяжелой черепно-мозговой травмой (ЛЧМТ и ТЧМТ) в 1–3-и сут

Примечание. По оси ординат данные ($M \pm m$) представлены в логарифмической шкале (основание 5). * — $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

первых суток ЧМТ. Их изменения в определенной мере отражают тяжесть и исход ЧМТ.

Наиболее важным последствием сниженной активности ключевых ферментов I и II комплексов дыхательной цепи митохондрий должны являться изменения в синтезе АТФ, поэтому в настоящей работе мы определили его содержание в лимфоцитах больных с ЧМТ ($n = 15$). Проведенный корреляционный анализ изменений активности митохондриальных ферментов и уровня АТФ в лимфоцитах выявил прямую взаимосвязь этих показателей у больных: чем ниже активность митохондриальных ферментов, тем меньше уровень АТФ (рис. 4).

На рис. 5 представлены данные о содержании оксида азота у детей с ЧМТ. Как видно, у детей с легким течением ЧМТ уровень NO_x в сыворотке крови был несколько выше, чем в контрольной группе, но значительно меньше, чем у детей с тяжелой ЧМТ, у которых уровень метаболитов NO_x в сыворотке крови в десятки раз превышал как их контрольный уровень, так и их содержание при благоприятном исходе ЧМТ. На рис. 6. представлены данные об изменении содержания 3-нитротирозина в плазме крови детей с ЧМТ в 1–3-и сут: содержание продукта было повышено и зависело от тяжести повреждения (чем тяжелее ЧМТ, тем выше уровень 3-нитротирозина).

Обсуждение

Полученные данные представляют несомненный интерес в нескольких направлениях. Прежде всего, наши исследования были проведены на лимфоцитах. Лимфоцит входит в состав так называемой нейроваскулярной единицы (НВЕ) — структурно-функционального комплекса, обеспечивающего работу гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и скоординированную активность нейронов, глии и эндотелия церебральных сосудов. Основные изменения при травматическом повреждении мозга про-

исходят именно на уровне НВЕ [13]. Именно поэтому лимфоцит может служить удобной клеточной моделью для исследования процессов в нейронах головного мозга [14]. Кроме того, установлено, что на плазматической мембране лимфоцитов также имеются глутаматные рецепторы [14, 15], роль которых при ЧМТ чрезвычайно важна, учитывая гипотезу эксайтотоксичности как основного патофизиологического механизма повреждения нейронов при ЧМТ [4].

Во-вторых, нами впервые получены данные о функциональном состоянии митохондрий у детей с ЧМТ, о котором мы судили на основании изменений активности двух важных ферментов электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий лимфоцитов, NADH-Д и СДГ. Мы обнаружили, что у детей с тяжелой ЧМТ активность NADH-Д и СДГ достоверно уменьшена, причем у детей с летальным исходом сниженная активность этих ферментов была наиболее выраженной. Эти данные позволили предположить, что при ЧМТ происходит нарушение работы I и II комплексов ЭТЦ митохондрий лимфоцитов. Действительно, исследования на животных с ЧМТ выявили значимые изменения митохондриальной биоэнергетики, ключевым результатом которой являются нарушения в функционировании I и II комплексов ЭТЦ митохондрий [16]. Показано, что активность митохондриальных дегидрогеназ, в частности NADH-Д и СДГ, регулируется ионами кальция [17], нарушения гомеостаза которого в нейронах при ЧМТ являются определяющими.

Установлено, что глутаматная эксайтотоксичность является основным механизмом повреждения и гибели нейронов при ЧМТ [4]. Проведенные ранее исследования на первичных культурах нейронов показали, что при глутаматной эксайтотоксичности происходит развитие кальциевой дисрегуляции и митохондриальной деполаризации, уменьшается активность I и II комплексов дыхательной цепи, нарушается сопряжение окисления NADH с синтезом АТФ [18], и уровень АТФ в результате этого значительно уменьшается [19]. В настоящей работе у детей с ЧМТ наряду со снижением активности NADH-Д и СДГ мы также обнаружили снижение содержания АТФ в лимфоцитах, причем выявлена прямая корреляционная зависимость между активностью митохондриальных дегидрогеназ и уровнем АТФ.

Многочисленные клинические и экспериментальные исследования показали, что повреждение нейронов при гипоксии/ишемии мозга вследствие ЧМТ связано с развитием патологических реакций, среди которых центральное место занимают избыточное образование АФК и NO_x наряду с нарушениями функционального состояния митохондрий [20].

В настоящей работе у больных с различным течением ЧМТ определялось содержание NO_x и 3-нитротирозина — продукта, образованного в результате модификации белков, вызванного пероксинитритом [21, 22]. Мы показали, что в зависимости от тяжести ЧМТ содержание NO_x в крови этих больных значительно повышается, и, как следствие, быстро образуется высокотоксичный метаболит пероксинитрит, который нитрозилирует тирозиновые остатки различных белков, в результате уровень 3-нитротирозина повышается. Действительно, в настоящей работе мы выявили значительное увеличение содержания 3-нитротирозина, при этом чем более неблагоприятен был исход ЧМТ, тем более выражено было его увеличение, что совпадает с результатами других наблюдений у взрослых больных с ЧМТ [22, 23]. Необходимо отметить, что, по данным литературы, у здоровых людей 3-нитротирозин в плазме крови не выявляется, что связано с

достаточной активностью антиоксидантных систем [22]. Однако при ишемии мозга, в том числе и при ЧМТ, в плазме крови обнаруживается 3-нитротирозин, что связано с увеличением уровня NO_x , образованием пероксинитрита и снижением активности антиоксидантных систем. Имеются также данные, что пероксинитрит вызывает нитрозилирование таких митохондриальных белков, как NADH- и сукцинатдегидрогеназ, тем самым снижая их активность, что может быть одним из патогенетических факторов повреждения мозга при ЧМТ [22, 23].

Выявленные нарушения функции митохондрий у детей с ЧМТ ведут к открытию во внутренней мембране митохондрий неспецифической поры высокой проводимости (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) [8]. На экспериментальных моделях ЧМТ показано, что ингибитор mPTP циклоспорин А или его аналоги улучшают когнитивные функции у животных, перенесших ЧМТ [24]. Учитывая важную роль глутаматной эксайтотоксичности в механизмах повреждения и гибели нейронов, можно предположить, что при ЧМТ происходит гиперстимуляция глутаматных рецепторов, которая приводит к накоплению в митохондриях нейронов Ca^{2+} , возникновению выраженной митохондриальной деполяризации, нарушениям в I и II комплексах ЭТЦ митохондрий, образованию mPTP и снижению содержания АТФ, в результате чего происходят выброс кальция из митохондрий и развитие высокого Ca^{2+} -плато, усиленное образование АФК и NO_x , появление в цитозоле нейронов цитохрома С и апоптоз-индуцирующего фактора [8, 24]. Все это в конечном счете приводит к гибели нейронов.

Заключение

Обнаруженная при ЧМТ у детей митохондриальная дисфункция в лимфоцитах, выражающаяся снижением активности NADH-Д и СДГ в посттравматический период и, как следствие, уменьшением образования АТФ, может рассматриваться в качестве системного фактора, отражающего нарушения в центральной нервной системе. Полученные данные указывают на то, что обнаруженные изменения активности NADH-Д в 1-е сут свидетельствуют о раннем включении митохондрий в механизмы повреждения нейронов мозга при ЧМТ и определяют тяжесть повреждений и их прогноз. У обследованных больных также было обнаружено увеличенное образование NO_x и 3-нитротирозина, которые также могут приводить к повреждению и гибели клеток мозга, обуславливая неблагоприятный исход ЧМТ. Выявленные нарушения могут быть мишенями для адекватной терапии ЧМТ.

Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда: гранты № 12-06-00943 и № 15-06-10952.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие иных явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

- Mendes AA, de Souza LF, Walz R, Dafre A. Perspectives on Molecular Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Strategies in Traumatic Brain Injury. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–18. doi: 10.1155/2014/723060
- Потапов АА, Рошаль ЛМ, Лихтерман ЛБ, Кравчук АД. Черепно-мозговая травма: проблемы и перспективы. *Вопросы нейрохирургии в институте имени Н.Н. Бурденко*. 2009;2:3–8.
- Валиуллина СА, Семенова ЖБ, Шарова ЕА. Организационно-экономические и управленческие аспекты оказания медицинской помощи детям с черепно-мозговой травмой. *Российский педиатрический журнал*. 2010;26:37–48.
- Algattas H, Huanq JH. Traumatic brain injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post injury. *Int J Mol. Sci*. 2014;15(1):309–341. doi: 10.3390/ijms15010309
- Пинелис ВГ, Сорокина ЕГ. Аутоиммунные механизмы модуляции активности глутаматных рецепторов у детей с эпилепсией и черепно-мозговой травмой. *Вестник РАМН*. 2008;12:44–51.
- Stoica BA, Faden AI. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):3–12. doi: 10.1016/j.nurt.2009.10.023
- Xiong Y, Gu Q, Peterson PL, Muizelaar JP, Lee CP. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 1997;14:23–34. doi: 10.1089/neu.1997.14.23
- Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res*. 2005;79(1–2):231–239. doi: 10.1002/jnr.20292
- Robertson CL, Scafidi S, McKenna MC, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of cell death and neuroprotection in pediatric ischemic and traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2009;218(2):371–380. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.04.030
- Balan IS, Saladino AJ, Aarabi B, Castellani RJ, Wade C, Stein DM, Eisenberg HM, Chen HH, Fiskum G. Cellular alterations in human traumatic brain injury: changes in mitochondrial morphology reflect regional levels of injury severity. *J Neurotrauma*. 2013;30(5):367–381. doi: 10.1089/neu.2012.2339
- Vinogradov AD. NADH/NAD⁺ interaction with NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim Biophys Acta*. 2008;1777(7–8):729–734. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.04.014
- Нарциссов РП. Анализ изображения клетки — следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии. *Педиатрия*. 1998;4:101–105.
- Vangilder RL, Rosen CL, Barr TL, Huber JD. Targeting the neurovascular unit for treatment of neurological disorders. *Pharmacol Ther*. 2011;130(3):239–247. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.12.004
- Boldyrev AA, Kazey VI, Leinsoo TA, Mashkina AP, Tyulina OV, Johnson P, Tuneva JO, Chittur S, Carpenter DO. Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(1):133–139. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.019
- Болдырев АА, Брюшкова ЕА, Владыченская ЕА. NMDA-рецепторы в клетках иммунной системы. *Биохимия*. 2012;77(2):160–168.
- Lifshitz J, Friberg H, Neumar RW, Raghupathi R, Welsh FA, Janmey P, Saatman KE, Wieloch T, Grady MS, McIntosh TK. Structural and functional damage sustained by mitochondria after traumatic brain injury in the rat: evidence for differentially sensitive populations in the cortex and hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(2):219–231. doi: 10.1097/00004647-200302000-00009
- Denton RM, Rutter GA, Midgley PJ, McCormack JG. Effects of Ca^{2+} on reactivities of the calcium-sensitive dehydrogenases within the mitochondria of mammalian tissues. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1988;12(Suppl.5):69–72. doi: 10.1097/00005344-198806125-00012

18. Сурин АМ, Зобова СН, Тухбатова ГР, Сенилова ЯЕ, Пинелис ВГ, Ходоров БИ. Изменения митохондриального NAD(P)H и нарушения кальциевого гомеостаза в культивируемых нейронах мозжечка крысы при гиперстимуляции глутаматных рецепторов. В сб. материалов международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». М. 2009. С. 157–162.
19. Surin AM, Gorbacheva LR, Savinkova IG, Sharipov RR, Khodorov BI, Pinelis VG. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. *Biochem (Mosc.)*. 2014;79(2):146–152. doi: 10.1134/S0006297914020084
20. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei EZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related compounds. *Nature*. 1993;364:626–632. doi: 10.1038/364626a0
21. Nag S, Picard P, Stewart DJ. Expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine during blood-brain barrier breakdown and repair after cold injury. *Lab Invest*. 2001;81(1):41–49. doi: 10.1038/labinvest.3780210
22. Bayir H, Kagan VE, Clark RS, Janesko-Feldman K, Rafikov R, Huang Z, Zhang X, Vagni V, Billiar TR, Kochanek PM. Neuronal NOS mediated nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in brain after experimental and human brain injury. *J Neurochem*. 2007;101(1):168–181. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04353.x
23. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1658(1–2):44–49. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.03.016
24. Readnower RD, Pandya JD, McEwen ML, Pauly JR, Springer JE, Sullivan PG. Post injury administration of the mitochondrial permeability transition pore inhibitor, NIM811, is neuroprotective and improves cognition after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2011;28(9):1845–1853. doi: 10.1089/neu.2011.1755

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Закиров Рустам Шакирович, врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России
Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, **тел.:** +7 (495) 967-14-20,
e-mail: cytochemistry@gmail.com

Сорокина Елена Геннадьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, **тел.:** +7 (495) 967-14-20, **e-mail:** sorokelena@mail.ru

Карасёва Ольга Витальевна, доктор медицинских наук, заместитель директора по науке, руководитель отдела сочетанной травмы, анестезиологии-реанимации ГУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ

Адрес: 119180, Москва, ул. Б. Полянка, д. 20, **тел.:** +7 (495) 959-19-72, **e-mail:** karaseva.o@list.ru

Семёнова Жанна Борисовна, доктор медицинских наук, руководитель отдела нейрохирургии и нейротравмы ГУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ

Адрес: 119180, Москва, ул. Б. Полянка, д. 20, **тел.:** +7 (495) 959-19-72, **e-mail:** jseman@mail.ru

Петричук Светлана Валентиновна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии и экспериментальной вирусологии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, **тел.:** +7 (495) 967-14-20, **e-mail:** cito@list.ru

Рошаль Леонид Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, президент ГУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ

Адрес: 119180, Москва, ул. Б. Полянка, д. 20, **тел.:** +7 (495) 959-19-72, **e-mail:** lmroshal@mail.ru

Пинелис Всеволод Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, **тел.:** +7 (495) 967-14-20, **e-mail:** pinelis@mail.ru