

УДК 616.1/9-055.5/7-092]-085:616.891:616.831-001.001.6

Влияние липосомальной трансфекции гена аполипопротеина Е3 на динамику неврологического и когнитивного дефицита при черепно-мозговой травме в эксперименте

Белошицкий В.В., Гридина Н.Я., Цыба Л.А., Величко О.Н.

Институт нейрохирургии им.акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев

Вступление. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является актуальной проблемой современного общества и медицины. По данным Национального института неврологических расстройств и инсульта (США) (www.ninds.nih.gov) только в Соединенных Штатах у 270000 пострадавших регистрируют ЧМТ средней тяжести или тяжелую, вследствие которой 70000 из них умирают, у 80000 — отмечают тяжелую инвалидность. В Китае в приемные отделения поступает 1 млн. пострадавших с ЧМТ в год, умирают 100000 потерпевших [5]. В Украине в середине 90-х годов XX столетия частота ЧМТ в разных регионах составляла от 2,3 до 6, в среднем 4–4,2 на 1000 населения, то есть число потерпевших достигало 200000 в год [3].

Не менее серьезной проблемой являются последствия ЧМТ. В США от 2,5 до 6,5 млн. человек испытывают социально-экономические трудности в связи с неврологическими, когнитивными и психосоциальными последствиями ЧМТ [7]. Это оправдывает необходимость разработки методов лечения, позволяющих воздействовать на клеточно-молекулярные звенья патогенеза ЧМТ, лежащие в основе посттравматического неврологического и когнитивного дефицита.

Целью работы было изучение влияния генной терапии, обуславливающей индукцию синтеза изоформы $\epsilon 3$ аполипопротеина Е в ткани поврежденного головного мозга, на выраженность двигательных расстройств и нарушения памяти и обучаемости при ЧМТ в эксперименте.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на 15 крысах-самцах линии Wistar с массой тела от 350 до 400 г разведения вивария Института. Животные распределены на 3 группы.

— *Контроль-1* — группа, в которой животным не наносили ЧМТ и не выполняли каких-либо хирургических манипуляций с лечебной целью (интактные).

— *Контроль-2* — группа животных с экспериментальной ЧМТ, которым в левый боковой желудочек устанавливали канюлю, соединенную с подкожным резервуаром, заполненным изотоническим раствором натрия хлорида вместо лекарственного средства.

— *Опыт* — группа животных с экспериментальной ЧМТ, которым в левый боковой желудочек устанавливали канюлю, соединенную с подкожным резервуаром для внутрижелудочковой инфузии препарата катионных липосом с плазмидным вектором, несущим ген аполипопротеина Е3 (АРОЕ3), в посттравматическом периоде.

Нанесение экспериментальной ЧМТ и все хирургические манипуляции выполняли под наркозом путем внутрибрюшинной инъекцией раствора тиопен-

тал-натрия (50 мг/кг). По завершении эксперимента на 10-е сутки животных умерщвляли путем внутрибрюшинной инъекции раствора тиопентал-натрия (200 мг/кг). Мозг извлекали из полости черепа для оценки эффективности трансфекции (определения mРНК, транскрибируемой с гена АРОЕ3) методом обратнотранскриптазной цепной реакции с полимеразой (RT-СRР) и гистологического исследования, результаты которого опубликованы нами ранее [1, 2].

Моделирование ЧМТ. Для воспроизведения у крыс тяжелой ЧМТ использовали «модель ударного ускорения» [14, 22], обеспечивавшую в основном диффузное повреждение мозга. Под общей анестезией выполняли продольный разрез скальпа головы длиной 2 см по средней линии с обнажением брегмы (точки пересечения коронарного и сагиттального швов черепа) и ламбды (точки пересечения сагиттального и ламбдовидного швов). Распатором и высушиванием костной поверхности к кости прочно с помощью зубного цемента фиксировали так называемый «шлем» — круглую стальную пластину диаметром 1 см в срединном положении между коронарным и ламбдовидным швами. Травму наносили путем падения с высоты 1,5 м на «шлем» груза массой 450 г с тупой поверхностью, что обеспечивало ускорение движения головы при минимальном локальном воздействии груза в точке приложения травмирующей силы.

Создание векторных конструкций для генной терапии. В работе использованы кДНК гена АРОЕ3 человека, субклонированная в вектор рUC18, предоставленная профессором G. Dickson и исследователем Т. Athanasopoulos (факультет биохимии Королевского Лондонского университета, Великобритания) и вектор рCMV·SPORT6 («Invitrogen», США), имеющий цитомегаловирусный промотор и сигнал полиаденилирования SV40, что позволяет экспрессировать клонированную в нем последовательность ДНК в эукариотических клетках. кДНК гена АРОЕ3 переклонировали в вектор рCMV·SPORT6, по сайтам рестриктаз SmaI и SalI, вектор обрабатывали рестриктазами HindIII и SalI, при этом концы ДНК после обработки рестриктазой HindIII тупили с помощью фрагмента Кленова. Полученную конструкцию рCMV·SPORT6-АРОЕ3 выделяли методом щелочного лизиса, используя реактивы и колонки tip 500 фирмы «Qiagen» (США).

Внутрижелудочковая инфузия плазмидного вектора, несущего ген АРОЕ3. Для доставки препарата в головной мозг крыс после нанесения травмы использовали «Наборы для мозговых инфузий» и осмотические помпы ALZET (производства DURECT Corp., США). Осмотические помпы заполняли в соответствии с инструкцией производителя: 5 — изотоническим раствором натрия хлорида (группа

Контроль-2), 5 — препаратом катионных липосом с плазмидным вектором, несущим ген АРОЕЗ (группа *Опыт*). Использовали модель помпы 2001D, обеспечивающую непрерывную инфузию препарата со скоростью 8 мкл/ч в течение 25 ч, что составляло суммарно около 200 мкл. Крысам группы *Опыт* осуществляли внутрижелудочковую инфузию 25 мкг плазмидной ДНК. Препарат катионных липосом/ДНК готовили с помощью реактива DOTAP Methosulfate (5 мкл на 1 мкг ДНК) (SIGMA-ALDRICH, США) в соответствии с инструкцией производителя. Систему, состоящую из канюли, катетера и осмотической помпы, собирали в соответствии с инструкцией производителя. Сразу после нанесения травмы голову животного фиксировали в стереотаксическом аппарате. «Шлем» и зубной цемент удаляли. Под кожей в области спины животного, начиная от нижнего края разреза и далее через межлопаточное пространство, корнцангом формировали карман для осмотической помпы. В проекции переднего рога левого бокового желудочка с помощью бормашины круглой фрезой на кость свода черепа накладывали фрезевое отверстие. Использовали следующие стереотаксические координаты переднего рога бокового желудочка: кзади от брегмы — 0,8 мм, латерально — 1,5 мм, дорсовентрально — 4,8 мм. Канюлю длиной 5 мм устанавливали через фрезевое отверстие и фиксировали к поверхности черепа зубным цементом. Осмотическую помпу погружали в подкожный карман. На рану кожи накладывали узловое атравматические швы. Животное извлекали из стереотаксического аппарата и помещали в клетку.

Оценка нарушений двигательной функции.

При оценке посттравматических двигательных дисфункций у крыс использовали наиболее часто употребляемый метод [16]. Исследователь, неинформированный о принадлежности животных к той или иной экспериментальной группе, оценивает по 5-балльной шкале (от 0 — тяжелое поражение до 4 — нормальная сила или двигательная функция) следующие показатели: 1) сгибание левой передней конечности при поднимании животного за хвост; 2) сгибание правой передней конечности при поднимании животного за хвост; 3) сгибание левой задней конечности в то время, когда передние конечности находятся на ровной поверхности, а задние — поднимаются тягой за хвост; 4) сгибание правой задней конечности в то время, когда передние конечности находятся на ровной поверхности, а задние — поднимаются тягой за хвост; 5) способность противостоять боковому толчку влево; 6) способность противостоять боковому толчку вправо; 7) способность стоять на наклонной поверхности в левой позиции (левым боком кверху); 8) способность стоять на наклонной поверхности в правой позиции (правым боком кверху); 9) способность стоять на наклонной поверхности в вертикальной позиции. В трех последних тестах максимальной оценкой (4 балла) оценивали способность животного стоять на плоскости, наклоненной под углом 40°, 3 балла — 37,5°, 2 балла — 35°, 1 балл — 32,5°, 0 баллов — менее 32,5°.

Оценку двигательной функции проводили в группах *Контроль-2*, *Опыт* в день эксперимента, до нанесения травмы (0-е сутки) и с 1-х по 7-е сутки после травмы. В группе *Контроль-1* этот показатель

оценивали в течение тех же 8 сут. Общий функциональный показатель для каждого животного определяли путем суммирования баллов, полученных во всех тестах.

Оценка нарушения когнитивных функций.

Нарушение когнитивных функций после экспериментальной ЧМТ выявляли путем оценки пространственной памяти в водном лабиринте Морриса. Поскольку нарушения памяти сохраняются после экспериментальной ЧМТ более длительно, чем двигательными нарушениями [15], исследования в водном лабиринте Морриса проводили в период с 7-х по 10-е сутки после травмы, чтобы имевшийся ранее неврологический дефицит не влиял на способность животных плавать, делая недостоверными результаты теста.

Водный лабиринт Морриса представлял собой круглый бак диаметром 140 см, высотой 45 см, заполненный теплой водой, которую делали непрозрачной путем добавления красителя (высота заполнения бака водой 30 см). В постоянное место бака помещали подвижную платформу диаметром 10 см, высотой 28 см, поверхность которой расположена на 2 см ниже поверхности воды. На 7–8–9–10-е сутки после нанесения травмы проводили 16 «тренировок» животных (4 в день), в которых их обучали находить платформу, полагаясь на внешние визуальные ориентиры. Во время каждой из 4 «тренировок» в течение дня животное погружали поочередно в одну из 4 постоянных «стартовых позиций» (их очередность в течение дня была случайной). После достижения животным платформы его оставляли там в течение 30 с, затем переносили в клетку. Между «тренировками» в течение дня соблюдали интервал 4 мин. В каждый день исследования для каждой крысы определяли показатель «времени поиска» — среднее для 4 «тренировок» время (в секундах), затраченное животным на достижение платформы. На основе этих данных определяли среднее «время поиска» для каждой из групп эксперимента в конкретный день исследования. Увеличение «времени поиска» свидетельствовало о большем дефиците пространственной памяти.

Данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики. Результаты *W*-теста показали, что все выборки в сравниваемых группах были распределены по нормальному закону. Поэтому для оценки статистической вероятности различий между средними значениями параметров в сравниваемых группах использовали *t*-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение.

Влияние трансфекции клеток головного мозга крыс геном АРОЕЗ на динамику двигательной дисфункции и когнитивных нарушений при экспериментальной ЧМТ. При исследовании неврологических нарушений у крыс при экспериментальной ЧМТ по шкале оценки двигательной дисфункции в группе *Контроль-2* отмечен выраженный неврологический дефект, который медленно регрессировал к 7-м суткам после травмы (*рис. 1*). Этот показатель во все сроки наблюдения достоверно отличался от такового в группе *Контроль-1*, то есть от нормы.

В группе *Опыт* проведенное лечение способствовало более быстрому регрессу неврологического дефицита у животных после травмы по сравнению

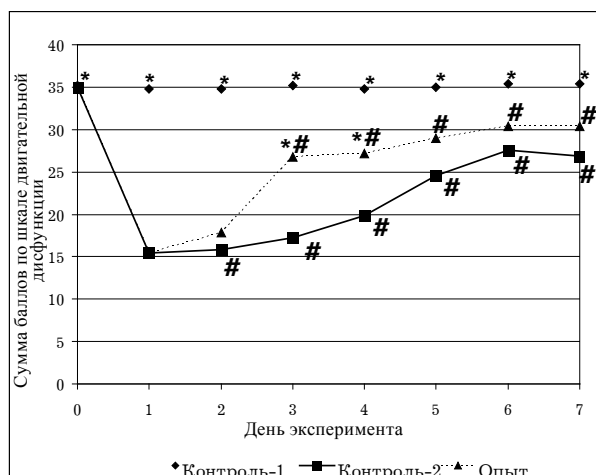


Рис. 1. Влияние генной терапии с использованием гена АРОЕЗ на динамику неврологического дефицита у крыс с экспериментальной ЧМТ.

* — Различия показателей по сравнению с таковыми в группе Контроль-2 достоверны;

— различия показателей по сравнению с таковыми в группе Контроль-1 достоверны.

с таковым в группе Контроль-2. При этом сумма баллов по шкале оценки двигательной дисфункции на 3-й и 4-е сутки после нанесения ЧМТ в группе Опыт достоверно превышала аналогичные показатели в группе Контроль-2 — соответственно (26,2±3,96) и (17,2±3,11) балла, (26,4±3,36) и (19,8±3,11) балла.

При оценке влияния генной терапии на динамику расстройств пространственной памяти у крыс с ЧМТ (рис. 2) установлено, что уже в первые сутки проведения исследования в водном лабиринте Морриса (7-е сутки после травмы) «время поиска» платформы в группе Контроль-2 — (86,4±4,32) с достоверно отличалось от этого показателя в группе Контроль-1 — (69,2±2,15) с. Такое различие обусловлено тем, что в группе Контроль-1 животные быстрее находили платформу уже на 3-й и 4-й «тренировках» первых суток исследования (7-е сутки после травмы). В последующие дни в группе Контроль-1 «время поиска» платформы быстро уменьшалось. В отличие от этого, в группе Контроль-2 «время поиска» уменьшалось более медленно и во все сроки наблюдения достоверно превышало аналогичный показатель в группе Кон-

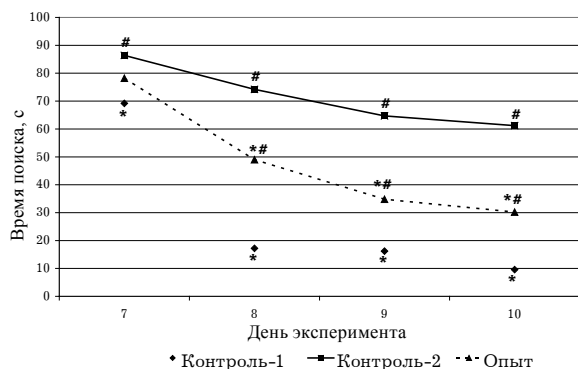


Рис. 2. Влияние генной терапии с использованием гена АРОЕЗ на динамику когнитивных нарушений у крыс с экспериментальной ЧМТ.

* — Различия показателей по сравнению с таковыми в группе Контроль-2 достоверны;

— различия показателей по сравнению с таковыми в группе Контроль-1 достоверны.

троль-1 — соответственно (74,2±3,27) и (17,2±2,28) с — на 8-е сутки, (64,7±4,03) и (16,2±1,8) с — на 9-е сутки, (61,2±3,62) и (9,6±2,16) с — на 10-е сутки. Это свидетельствовало, что под влиянием экспериментальной ЧМТ у животных возникал отчетливый дефицит пространственной памяти и значительно ухудшалась их обучаемость.

В группе Опыт отмечено положительное влияние трансфекции гена АРОЕЗ на регресс когнитивных нарушений у экспериментальных животных. «Время поиска» оказалось достоверно меньшим по сравнению с таковым в группе Контроль-2 на 8–10-е сутки. Так, на 8-е сутки эксперимента этот показатель в группе Опыт составлял (49,0±3,41) с, в группе Контроль-2 — (74,2±3,27) с, на 9-е сутки — соответственно (34,8±2,02) и (64,2±4,03) с, на 10-е сутки — (30,2±2,15) и (61,2±3,62) с (различия достоверны во все сроки наблюдения).

Приведенные данные свидетельствуют, что трансфекция клеток поврежденного головного мозга геном АРОЕЗ способствовала более быстрому регрессу неврологического дефицита и уменьшению выраженности когнитивных нарушений, в частности, уменьшению дефицита пространственной памяти и обучаемости.

В опубликованных нами ранее исследованиях установлено, что применение у экспериментальных животных (крыс) с тяжелой закрытой ЧМТ генной терапии, а именно индукции синтеза изоформы ε3 апополипротеина Е человека в ранние сроки после травмы, оказывало протекторное действие на паренхиму и сосудистую систему головного мозга, предотвращало образование зон вторичной дезинтеграции в поврежденном мозге. Об этом свидетельствовала значительно меньшая (следовая) выраженность признаков нарушения проницаемости капилляров и повреждения паренхимы мозга с уменьшением его реактивного отека у леченых животных [1]. По данным морфометрического и ультраструктурного исследований применение выбранного метода лечения оказывало значительное позитивное влияние на структуру и ультраструктуру гиппокампа, значительно уменьшая ЧМТ-индуцированную гибель нейронов, повреждение аксонов, глиоз и микроглиальную реакцию [2].

В настоящее время отмечают, что разработка экспериментальных моделей, воспроизводящих клеточные и субклеточные изменения, возникающие при ЧМТ у человека, хотя и улучшила понимание механизмов, лежащих в основе посттравматического неврологического дефицита, однако не способствовала появлению доступных методов нейропротекции в клинике [11]. Разрыв между экспериментальными данными и клинической практикой может быть преодолен, если уделить больше внимания оценке неврологического и поведенческого дефицита в стадии доклинических исследований. При этом одной из важных задач экспериментальной нейротравматологии является установление связи клеточных механизмов, определяющих посттравматическую клеточную дисфункцию и гибель клеток, с неврологическими и когнитивными нарушениями. Однако сложность анатомических структур, лежащих в основе двигательных и когнитивных функций, затрудняет сопоставление функциональных нарушений у человека с таковыми у малых животных. В связи с этим необходимы разработка и выбор функциональных тестов, простых в использовании и интерпрета-

ции и одновременно позволяющих экстраполировать полученные результаты в клинику [7].

Для оценки двигательных нарушений у крыс нами использован метод, который оказался высоко достоверным для характеристики тяжести экспериментальной ЧМТ и, что особенно важно, изучения эффективности проведенного лечения [6, 9, 16, 19, 21]. С помощью шкалы определения двигательной дисфункции оценивают силу и объем рефлекторных движений передних и задних конечностей, сопротивление боковому толчку, способность балансировать на наклонной плоскости. Оценка показателей в баллах способствует повышению чувствительности теста, позволяя объективно выявлять незначительную разницу показателей у испытуемых животных. *Рефлекс сгибания передних конечностей* выявляют у крыс и мышей путем тяги животного за хвост с опусканием головы вниз. Нетравмированное животное немедленно вытягивает к полу обе передние конечности, несколько согнутые в локтевых суставах. У травмированной крысы этот рефлекс не возникает вовсе, или отмечают спастические подергивания пораженной конечности либо движения, перпендикулярные оси тела. Этот тест оказался эффективным на модели ЧМТ, использованной в нашем исследовании («модель ударного ускорения») [17].

Рефлекс сгибания задних конечностей выявляют, когда животное ставят на ровную поверхность. Задние конечности поднимаются вверх (с отрывом от поверхности) путем тяги за хвост. Нетравмированное животное при этом вытягивает задние конечности назад и кнаружи с полным их разгибанием и вытягиванием пальцев. У животных с ЧМТ наблюдают дефицит любого компонента этих движений [8]. Способность животного координировать движения всех четырех конечностей для сохранения положения тела при приложении силы сбоку оценивают в *тесте бокового толчка*. Животное помещают на ровной поверхности и прикладывают легкое давление к боковой поверхности туловища с целью свалить крысу набок. Здоровое животное сохраняет устойчивость к падению набок, тогда как у травмированной крысы сопротивление меньше на стороне с двигательными нарушениями [18]. Еще одним методом, позволяющим комплексно оценивать силу и координацию движений, является *тест на наклонной плоскости*, разработанный первоначально для оценки поведения животных со спинномозговой травмой. При различных моделях ЧМТ, в том числе использованной нами [4], угол наклона плоскости, на которой животное может стоять без падения, коррелирует с тяжестью травмы мозга.

В нашем исследовании под влиянием генной терапии отмечен регресс неврологического дефицита у крыс с тяжелой диффузной ЧМТ.

Результаты исследования свидетельствуют также, что трансфекция клеток пораженного мозга геном АРОЕЗ способствует регрессу обусловленных травмой когнитивных нарушений у экспериментальных животных. При этом выраженность когнитивных нарушений у крыс с экспериментальной ЧМТ, в частности, расстройств пространственной памяти, определяли с помощью водного лабиринта Морриса. Во многих исследованиях было показано, что использование этого метода позволяет точно охарактеризовать как тяжесть экспериментальной ЧМТ, так и эффективность ее лечения. В частности, на модели посттравматической ишемии установле-

на эффективность предупреждения ее негативных последствий при комбинированном назначении блокаторов мускариновых и NMDA-рецепторов, скополамина и МК-801 [9]. Доказана положительная роль аналогов тиротропин-рилизинг гормона [6], сочетания трансплантации фетальной нервной ткани и внутримозговой инфузии фактора роста нервов [20] в лечении посттравматических когнитивных расстройств. Таким же способом было показано положительное влияние торможения процессов программируемой клеточной смерти в посттравматическом периоде при применении соединения АК295, ингибитора кальпаина — одного из важных эффекторов апоптоза, на регресс посттравматической ретроградной амнезии [19], а также других методов нейропротекции.

Оценка влияния методов лечения ЧМТ на состояние когнитивных функций индивидуума чрезвычайно важна. Тяжелая и средней тяжести ЧМТ у человека часто обуславливает инвалидизацию при отсутствии грубых очаговых симптомов (нарушения движений, речи) вследствие нарушения тонких нейропсихических функций, что обуславливает социальную дезадаптацию пострадавшего. Дефицит когнитивных функций у больных связывают с часто возникающим при ЧМТ повреждением гиппокампа [12]. Кроме того, установлена корреляция нарушений памяти с морфологическими изменениями в миндалевидных ядерных комплексах и диэнцефальных структурах [23]. В частности, возникновение антероградной амнезии, то есть нарушение памяти на текущие события после ЧМТ у человека связывают с двусторонним повреждением СА1-отделов гиппокампа [23].

Нарушения когнитивных функций при экспериментальной ЧМТ у крыс и мышей, выявляемые путем оценки пространственной памяти в водном лабиринте Морриса, также коррелируют с отсроченной гибелью нейронов в СА3 [16, 20] и СА1 [9] отделах гиппокампа. Возникновение дефицита пространственной памяти при экспериментальной ЧМТ может быть обусловлено апоптозом нейронов зубчатой извилины гиппокампа [10]. Учитывая, что у пострадавших с легкой и средней тяжести ЧМТ невозможно сопоставить степень нарушений памяти с выраженностью структурных изменений в мозге из-за низкой летальности, интересной представляется работа, в которой отмечено, что продолжительные нарушения когнитивных функций возникают при легкой экспериментальной ЧМТ, не сопровождающейся гибелью клеток гиппокампа [13]. Авторы приводят доказательства, что даже при легкой ЧМТ выявляют чрезмерное патологическое возбуждение нейронов, что обуславливает нарушение нормальных синаптических связей нейронов гиппокампа и функциональный дефект.

Результаты нашего исследования свидетельствуют, что генная терапия, направленная на запуск синтеза в клетках ЦНС изоформы $\epsilon 3$ человеческого ароЕ при экспериментальной ЧМТ у крыс, способна предотвращать или уменьшать выраженность как структурных изменений [1, 2], так и обусловленных морфологическими изменениями функциональных нарушений. С учетом приведенных данных литературы наши результаты свидетельствуют об эффективности предложенного метода лечения экспериментальной ЧМТ и подтверждают перспективность использования генной терапии при травматическом повреждении мозга.

Выводы 1. Генная терапия является эффективным методом лечения ЧМТ в эксперименте.

2. Индукция синтеза в нервной ткани изоформы $\epsilon 3$ ароЕ человека с помощью плазмидного вектора, доставляемого в клетки катионными липосомами, способствует более быстрому регрессу неврологических и когнитивных нарушений при экспериментальной ЧМТ.

3. Комплексная оценка тяжести неврологического дефицита с использованием шкалы двигательной дисфункции и когнитивных нарушений в водном лабиринте Морриса позволяет объективно судить о тяжести повреждения и эффективности лечения при экспериментальной ЧМТ.

Список литературы

1. Белошицкий В.В., Семенова В.М., Гридина Н.Я. и др. Влияние генной терапии на структурные проявления черепно-мозговой травмы в эксперименте // Укр. нейрохирург. журн. — 2009. — №1. — С.14–20.
2. Михальский С.А., Белошицкий В.В., Цыба Л.А. и др. Влияние трансфекции гена аполипопротеина Е человека на структуру гиппокампа и когнитивные нарушения после черепно-мозговой травмы у крыс разного возраста // Пробл. старения и долголетия. — 2008. — Т.17, №2. — С.240–258.
3. Педаченко Є.Г., Морозов А.М. Стан і перспективи організаційного вдосконалення в Україні спеціалізованої допомоги при черепно-мозковій травмі // Перший з'їзд нейрохірургів України: Тези доп. — К., 1993. — С.10.
4. Beaumont A., Marmarou A., Czigner A. et al. The impact-acceleration model of head injury: injury severity predicts motor and cognitive performance after trauma // *Neurol. Res.* — 1999. — V.21, N8. — P.742–754.
5. Chen X., Zhang K.-L., Yang S.-Y. et al. Glucocorticoids aggravate retrograde memory deficiency associated with traumatic brain injury in rats // *J. Neurotrauma.* — 2009. — V.26. — P.253–260.
6. Faden A.I., Fox G.B., Fan L. et al. Novel TRH analog improves motor and cognitive recovery after traumatic brain injury in rodents // *Am. J. Physiol.* — 1999. — V.277. — P.1196–1204.
7. Fujimoto S.T., Longhi L., Saatman K.E. et al. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 2004. — V.28. — P.365–378.
8. Furukawa T., Hoshino S., Kobayashi S. et al. The glutamate AMPA receptor antagonist, YM872, attenuates cortical tissue loss, regional cerebral edema, and neurological motor deficits after experimental brain injury in rats // *J. Neurotrauma.* — 2003. — V.20, N3. — P.269–278.
9. Jenkins L.W., Lu Y.-C., Johnston W.E. et al. Combined therapy affects outcomes differentially after mild traumatic brain injury and secondary forebrain ischemia in rats // *Brain Res.* — 1999. — V.817. — P.132–144.
10. Kaya S.S., Mahmood A., Li Y. et al. Apoptosis and expression of p53 response proteins and cyclin D1 after cortical impact in rat brain // *Brain Res.* — 1999. — V.818, N1. — P.23–33.
11. Laurer H.L., McIntosh T.K. Experimental models of brain trauma // *Curr. Opin. Neurol.* — 1999. — V.12, N6. — P.715–721.
12. Levin H.S. Neurobehavioral outcome of closed head injury: implications for clinical trials // *Traumatic Brain Injury: Bioscience and Mechanics* / Eds. F.A. Bandak, R.H. Eppinger, A.K. Ommaya. — Larchmont; New York: Mary Ann Liebert, 1996. — P.105.
13. Lyeth B.G., Jenkins L.W., Hamm R.J. et al. Prolonged memory impairment in the absence of hippocampal cell death following traumatic brain injury in the rat // *Brain Res.* — 1990. — V.526. — P.249–258.
14. Marmarou A., Foda M.A., van den Brink W. et al. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I. Pathophysiology and biomechanics // *J. Neurosurg.* — 1994. — V.80. — P.291–300.
15. Morris R.G.M. Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat // *J. Neurosci. Methods.* — 1984. — V.11. — P.47–60.
16. Philips M.F., Mattiasson G., Wieloch T. et al. Neuroprotective and behavioral efficacy of nerve growth factor-transfected hippocampal progenitor cell transplants after experimental traumatic brain injury // *J. Neurosurg.* — 2001. — V.94, N5. — P.765–774.
17. Rancan M., Otto V.I., Hans V.H. et al. Upregulation of ICAM-1 and MCP-1 but not of MIP-2 and sensorimotor deficit in response to traumatic axonal injury in rats // *J. Neurosci. Res.* — 2001. — V.63, N5. — P.438–446.
18. Riess P., Bareyre F., Saatman K.E. et al. Effects of chronic, post-injury cyclosporin A administration on motor and sensorimotor function following severe, experimental traumatic brain injury // *Restor. Neurol. Neurosci.* — 2001. — V.18. — P.1–8.
19. Saatman K.E., Murai H., Bartus R.T. et al. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — V.93. — P.3428–3433.
20. Sinson G., Voddi M., McIntosh T.K. Combined fetal neural transplantation and nerve growth factor infusion: effects on neurological outcome following fluid-percussion brain injury in the rat // *Neurosurg. Focus.* — 1999. — V.7, N3. — Art.3.
21. Yakovlev A.G., Knobloch S.M., Fan L. et al. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury // *J. Neurosci.* — 1997. — V.17, N19. — P.7415–7424.
22. Yang X.Y., Yang S.Y., Zhang J.N., Xue L. Experimental study on expression and activation of caspase 3 after acute brain trauma // *Proceedings 12th World Congress of Neurosurgery.* — 2001. — P.155–157.
23. Zola-Morgan S., Squire L.R., Amaral D.G. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 on the hippocampus // *J. Neurosci.* — 1986. — V.6. — P.2950–2967.

**Вплив ліпосомальної трансфекції гена аполіпопротеїна Е3
на динаміку неврологічного та когнітивного дефіциту
при черепно-мозковій травмі в експерименті**

Білошицький В.В., Гридіна Н.Я., Циба Л.О., Величко О.М.

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

Мета роботи — вивчення впливу генної терапії, що спричиняє індукцію синтезу ізоформи ε3 аполіпопротеїну Е (АРОЕ3) в тканині травмованого головного мозку, на вираженість рухових розладів і порушень пам'яті та здатності до навчання при черепно-мозковій травмі (ЧМТ) в експерименті. Тяжку ЧМТ завдавали щурам під загальною анестезією шляхом вільного падіння вантажу масою 450 г з висоти 1,5 м. Внутрішньошлуночкову інфузію катіонних ліпосом DOTAP, що несли 25 мкг плазмідного вектору pCMV·SPORT6 з кДНК гена АРОЕ3 здійснювали за допомогою осмотичних помп ALZET. Вираженість посттравматичного неврологічного дефіциту оцінювали за шкалою рухової дисфункції в день нанесення травми та з 1-ї до 7-ї доби після травми. Когнітивні функції (просторова пам'ять та здатність до навчання) оцінювали у водному лабіринті Морріса протягом 7–10 днів після травми. Результати дослідження свідчать, що індукція синтезу ізоформи ε3 апоЕ за допомогою плазмідного вектору, що доставлявся в клітини за допомогою катіонних ліпосом, сприяє більш швидкому регресові неврологічних і когнітивних розладів при експериментальній ЧМТ.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, генна терапія, аполіпопротеїн Е, рухові розлади, когнітивні порушення, експеримент.

**Влияние липосомальной трансфекции гена аполипопротеина Е3
на динамику неврологического и когнитивного дефицита
при черепно-мозговой травме в эксперименте**

Белошицкий В.В., Гридина Н.Я., Циба Л.А., Величко О.Н.

Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев

Цель работы — изучение влияния генной терапии, способствующей индукции синтеза изоформы ε3 аполипопротеина Е (АРОЕ3) в ткани травмированного головного мозга, на выраженность двигательных расстройств и нарушение памяти и обучаемости при черепно-мозговой травме (ЧМТ) в эксперименте. Тяжелую ЧМТ наносили крысам под общей анестезией путем свободного падения груза массой 450 г с высоты 1,5 м. Внутривентрикулярную инфузию катіонных ліпосом DOTAP, несущих 25 мкг плазмідного вектора pCMV·SPORT6 с кДНК гена АРОЕ3, осуществляли с помощью осмотических помп ALZET. Выраженность посттравматического неврологического дефицита оценивали по шкале двигательной дисфункции в день начала эксперимента, до нанесения травмы и с 1-х по 7-е сутки после травмы. Когнитивные функции (пространственная память и обучаемость) оценивали в водном лабиринте Морриса в течение 7–10 сут после травмы. Результаты исследования свидетельствуют, что индукция синтеза в нервной ткани изоформы ε3 апоЕ с помощью плазмідного вектора, доставляемого в клетки с помощью катіонных ліпосом, способствует более быстрому регрессу неврологических и когнітивних порушень при експериментальній ЧМТ.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, генная терапия, аполипопротеин Е, двигательные нарушения, когнитивные нарушения, эксперимент.

Influence of liposomal transfection of apolipoprotein E3 gene on neurologic and cognitive deficits dynamics at experimental traumatic brain injury

Biloshytsky V.V., Gridina N.Ya., Tsyba L.O., Velichko O.M.

Institute of neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov
of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

The aim of study was to estimate gene therapy influence, that promotes synthesis induction of ε3 apolipoprotein E (apoE3) in damaged brain tissue, on motor and memory dysfunction and learning disorders after experimental traumatic brain injury (TBI). Heavy TBI in rats was inflicted under overall anesthesia by free falling from 1.5 m of load weighting 450 g. The mixture of DOTAP liposome and 25 μg of plasmid vector pCMV·SPORT6 with cDNA of APOE3 gene was infused intraventricularly using ALZET osmotic pump. Posttraumatic neurologic deficits was estimated according to the scale of motor dysfunction at the first day of experiment before TBI infliction and from 1st to 7th day after trauma. Cognitive functions (spatial memory and learning) were tested in Morris water maze during 7–10 days after injury. The obtained results testified that cationic liposome-mediated APOE3 gene transfer caused quicker regress of neurologic and cognitive disorders after experimental TBI.

Key words: traumatic brain injury, gene therapy, apolipoprotein E, motor dysfunction, cognitive disorders, experiment.

Комментарий

к статье Белошицкого В.В. и соавторов «Влияние липосомальной трансфекции гена аполиipoproteина Е3 на динамику неврологического и когнитивного дефицита при черепно-мозговой травме в эксперименте»

Статья посвящена важной проблеме изучения нарушений ЦНС при ЧМТ и их коррекции с помощью современных молекулярно-генетических технологий. Во введении авторы приводят статистику о последствиях ЧМТ, согласно которой до 6 млн. пациентов в США испытывают социально-экономические трудности после ЧМТ. Эта статистика и является основным фактором, определяющим актуальность темы и необходимость разработки современных технологий коррекции неврологических нарушений и когнитивных функций у больных после ЧМТ.

Статья построена в соответствии с общепринятыми принципами, существенных замечаний нет. Каждое положение, метод или методический прием подтверждаются данными литературы. Детально описаны методы хирургического вмешательства, метод нанесения травмы и метод тестирования неврологического дефицита. Обсуждаемые положения и полученные результаты опытов детально анализируются, делается заключение об эффективности лечения последствий ЧМТ с помощью АРОЕ3.

В качестве замечания, необходимо отметить следующее.

Исследование выполнено у 15 животных, которые разделены на 3 группы. Это примерно по 5-6 животных в группе. Это очень малое число животных для решения таких сложных вопросов, как последствия ЧМТ и их коррекция. Целесообразно в будущем увеличить как число животных в отдельных группах, так и число групп, изучить значение дозы вводимого гена, сроков введения и более отдаленных последствий, показать, что с неврологическими проявлениями и в целом с ЦНС происходит через 1 мес, через 6 мес.

Несколько смущает масса тела и возраст животных — 350–400 г — это очень старые животные, что эквивалентно 70–80 годам у человека.

Высказанные замечания целесообразно учесть в будущих работах.

*Н.И. Лисяный, доктор мед. наук профессор,
зав. отделом нейроиммунологии
Института нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины*