

Оригінальні статті

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

Влияние генной терапии на структурные повреждения при черепно-мозговой травме в эксперименте

Белошицкий В.В., Семенова В.М., Гридина Н.Я., Цыба Л.А., Васильева И.Г., Чопик Н.Г.

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

Патологические изменения, возникающие при черепно-мозговой травме (ЧМТ), представляют собой «не отдельные события, а процессы, запущенные в движение механическим воздействием на центральную нервную систему. Эти процессы не завершаются в сколько-нибудь обозримые сроки после травмы» [24], представляя непредсказуемо длительный период. Обусловленное ЧМТ первичное повреждение ткани мозга различной тяжести, индуцирующее в основном эффекты «возбуждающих» аминокислот и ионов Ca^{2+} , происходит в течение относительно непродолжительного времени, что существенно ограничивает возможности фармакологической коррекции посттравматических реакций мозга. При этом считают, что первичное повреждение мозга сменяется процессом, получившим название «отсроченной клеточной смерти». Этот процесс может длиться в течение продолжительного времени (дни, недели, месяцы) после травмы и охватывает как зону травматической «пенумбры» (перифокальной зоны «полутени», клетки которой в течение определенного времени сохраняют относительно жизнеспособность на низком метаболическом уровне и могут в последующем как погибнуть, так и выжить), так и регионы мозга, расположенные на отдалении от очагов первичного повреждения. При этом количество нервных клеток, погибающих вследствие вторичного повреждения, может значительно превышать этот показатель в зоне первичной травмы. Вклад «отсроченной клеточной смерти» в формирование неврологического дефицита является весьма существенным. Вместе с тем, продолжительность периода вторичной гибели нервных клеток определяет существование так называемого «терапевтического окна», что позволяет проводить лечебные мероприятия, способствующие обеспечению нейропротекции [1, 9, 10, 14, 22, 23, 27, 28].

Одним из перспективных способов нейропротекции при ЧМТ может быть генная терапия — метод, позволяющий индуцировать в клетках поврежденного мозга синтез тех или иных белков с потенциальным терапевтическим эффектом.

Аполипопротеин Е (АРОЕ — обозначает ген, ароЕ — белок) — гликопротеин плазмы крови, играющий ведущую роль в метаболизме, транспорте и регуляции уровня холестерина и триглицеридов. После ЧМТ синтез ароЕ приобретает важнейшее значение для репарации липидного компонента мембран нейронов и глиоцитов, обеспечивая транспорт холестерина и фосфолипидов в ранней и промежу-

точной фазах процесса реиннервации. При ЧМТ у АРОЕ-дефицитных животных выявляют более грубые структурные изменения и худший функциональный исход [7, 19].

У человека существуют 3 изоформы белка ароЕ — $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ и $\epsilon 4$, которые различаются наличием аргинина либо цистеина в 112-й и 158-й позициях последовательности аминокислот. Первоначально аллель АРОЕ $\epsilon 4$ был идентифицирован как фактор риска возникновения болезни Альцгеймера. Было доказано, что носительство аллеля $\epsilon 4$ гена АРОЕ сопровождается дисфункцией липидтранспортных систем и при возникновении ЧМТ связано с худшим ростом нейритов и ремоделированием синапсов. Носительство $\epsilon 4$ -аллеля прямо коррелирует с наличием более массивных структурных изменений при ЧМТ у человека, худшим исходом травмы, возникновением отдаленных последствий, в частности, болезни Альцгеймера [3].

Возможность повлиять на баланс внутриклеточных процессов, которые, с одной стороны, реализуют эффекты первичной травмы и последующего вторичного повреждения мозга, с другой стороны, обеспечивают регенеративно-репаративные процессы в ЦНС, в настоящее время предоставляется путем трансфера в клетки травмированного мозга гена АРОЕ3 (АРОЕ3 — ген, кодирующий изоформу $\epsilon 3$ ароЕ).

Целью работы было изучение возможности улучшения исхода ЧМТ в эксперименте путем проведения генной терапии, направленной на индукцию синтеза ароЕ $\epsilon 3$ в ткани травмированного мозга.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 15 крысах-самцах линии Wistar, масса тела от 350 до 400 г, разводки вивария Института нейрохирургии. Животные распределены на 3 группы.

Контроль-1 — животным не наносили ЧМТ и не выполняли какие-либо хирургические манипуляции с лечебной целью (интактные).

Контроль-2 — животным наносили экспериментальную ЧМТ и устанавливали в левый боковой желудочек канюлю, которую соединяли с резервуаром, который заполняли изотоническим раствором натрия хлорида вместо лекарственного препарата, установленным под кожу.

Опыт — животным наносили экспериментальную ЧМТ и устанавливали в левый боковой желудочек канюлю, соединяли ее с резервуаром, установленным под кожу, для внутрижелудочковой инфузии препарата катионных липосом с плазмид-

ным вектором, несущим ген АРОЕЗ, в посттравматическом периоде.

Нанесение экспериментальной ЧМТ и все хирургические манипуляции выполняли под наркозом, внутрибрюшинно вводили раствор тиопентал-натрия (50 мг/кг). По завершении эксперимента на 10-е сутки животных умерщвляли путем внутрибрюшинной инъекции раствора тиопентал-натрия (200 мг/кг).

Моделирование ЧМТ. Для воспроизведения у крыс тяжелой ЧМТ использовали «модель ударного ускорения» [20, 28], которая обеспечивала в основном диффузное повреждение мозга. Под общей анестезией выполняли продольный разрез кожи 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). Обнажали свод черепа крысы с помощью распатора, высушивали поверхность, 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 в точке приложения травмирующей силы.

Создание векторных конструкций для генной терапии. В работе использованы кДНК гена АРОЕЗ человека, субклонированная в вектор рUC18, предоставленная профессором G. Dickson и исследователем T. Athanassopoulos (факультет биохимии Королевского Лондонского университета, Великобритания) и вектор рCMV·SPORT6 («Invitrogen», США), содержащий цитомегаловирусный промотор и сигнал полиаденилирования SV40, что позволяет экспрессировать клонированную в нем последовательность ДНК в эукариотических клетках. кДНК гена АРОЕЗ 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-АРОЕЗ выделяли в препаративных количествах методом щелочного лизиса, используя реактивы и колонки tip 500 фирмы «Qiagen» (США).

Внутрижелудочковая инфузия плазмидного вектора, несущего ген АРОЕЗ. Для доставки препарата в головной мозг крыс после нанесения травмы использовали «Наборы для мозговых инфузий» и осмотические помпы ALZET (производство DURECT Corp., США). Десять осмотических помп 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 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. В подкожной основе на спине 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, дорзовентрально — 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 швы атравматичной нитью. Животное извлекали из стереотаксического аппарата и помещали в клетку.

Оценка эффективности трансфекции. Эффективность трансфекции оценивали методом обратнотранскриптазной цепной реакции с полимеразой (RT-CRP) в образцах ткани мозга, полученных на 10-е сутки эксперимента. Поскольку RT-CRP является методом выявления определенной мРНК, а присутствие мРНК отражает экспрессию соответствующего гена, по наличию в ткани мозга АРОЕ-мРНК можно оценить эффективность его экспрессии в клетках головного мозга, перенесенного вектором гена АРОЕ. Праймеры для амплификации изучаемого гена подбирали с учетом их видовой уникальности, т.е. при обеспечении минимального совпадения последовательностей ДНК человека и крысы на изучаемом участке гена. Аполипротеины человека и крысы различаются последовательностью из около 30% аминокислот с карбоксильного конца. Нуклеотидные последовательности соответствующего участка гена АРОЕЗ человека выбраны в качестве мишеней для амплификации при проведении ЦРП. Использованы две пары праймеров для амплификации АРОЕЗ-гена в целях повышения специфичности реакции и исключения случайной контаминации изучаемыми продуктами:

- 1) 5'-GAACAACCTGACCCCGGTGGCGG-3', 5'-GATGGCGCTGAGGCCGCGCTC-3';
- 2) 5'-GAGCTGCGCCAGCAGACCGAGT-3', 5'-CTTCAACTCCTTCATGGTCTGG-3'.

Визуализацию продуктов амплификации (295 п.н. и 180 п.н. соответственно для первой и второй пары праймеров) проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

Гистологическое исследование. Для сравнительного гистологического исследования структурных изменений в мозге животных различных групп крыс умерщвляли через 10 суток после нанесения травмы путем внутрибрюшинной инъекции летальной дозы тиопентал-натрия (200 мг/кг). Мозг осторожно извлекали из полости черепа, макроскопически оценивали состояние мягких оболочек, рельефа, наличие кровоизлияний, локализацию видимых очагов ушиба. Для подтверждения эффективности трансфекции передние и задние отделы головного мозга (часть лобных долей, затылочные и часть теменных долей,

часть стволовых отделов мозга и мозжечок) отделяли скальпелем и помещали в жидкий азот для последующей RT-CRP. Извлеченный из полости черепа целый мозг 3 животных фиксировали в 20% растворе нейтрального формалина. Из фиксированного мозга вырезали фронтальные блоки, которые обрабатывали по стандартной методике. Из полученных блоков изготавливали серийные срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, гематоксилином и пикрофуксином (обзорные окраски) и тионином по Нисслию — для селективного выявления тонкой структуры нейроцитов. Гистологические препараты мозга экспериментальных животных изучали с помощью цитоанализатора изображения «Ibas-2000» с последующей фоторегистратией.

Результаты исследования.

Оценка эффективности трансфекции. Результаты исследований по изучению экспрессии гена ε3-изоформы АПОЕ3 человека в мозге животных, которым вводили плазмидный вектор, несущий соответствующий ген, представлены на **рис. 1 цветной вкладки**. В мозге крыс групп *Контроль-1* и *Контроль-2*, которым не вводили плазмидный вектор, несущий ген АРОЕ3, амплифицированный продукт с использованием обеих пар праймеров отсутствовал. В группе *Опыт* в мозге крыс, которым был введен вектор, несущий ген АРОЕ3, по наличию амплификации описанных участков кДНК методом RT-CRP выявлена мРНК, транскрибированная на перенесенном в клетки головного мозга гене. Это свидетельствовало об экспрессии гена АРОЕ3 человека при липосомной трансфекции клеток травмированной ЦНС крыс с использованием созданной нами векторной конструкции. Наличие экспрессии перенесенного в клетки гена подтверждено при использовании обеих пар праймеров.

Оценка влияния генной терапии на патоморфологические изменения в головном мозге при экспериментальной ЧМТ у крыс. По данным гистологического исследования ткани головного мозга крыс группы *Контроль-2* на 10-е сутки на значительном протяжении как конвексальной, так и базальной поверхности мозга определяли участки фрагментарного отслоения мягких оболочек головного мозга, их набухание и расслоение диффузно-очаговыми, нередко массивными скоплениями измененных эритроцитов. Местами в надбололочном и подбололочном пространствах обнаруживали геморрагические массы с наличием глыбок гемосидерина. Субарахноидальные кровоизлияния выявляли и по ходу мягких оболочек головного мозга, они проникали в переднюю межполушарную щель, а также по ходу борозд и извилин. Местами скопления крови располагались в поверхностных отделах коры и подлежащего белого вещества мозга, образуя небольшие очаги геморрагического инфарктирования, чаще клиновидной формы или более протяженные плоскостные — в пределах коры мозга. На основании мозга местами обнаружены сливные очаги геморрагического пропитывания его ткани.

Вокруг очагов полной или частичной деструкции вещества мозга видна перифокальная зона некробиотических изменений нервных клеток на фоне снижения плотности их распределения с появлением очагов опустошения вследствие гибели части нейроцитов. В сохранившихся нейроцитах обнаруживали

деформацию и сморщивание цитоплазматических тел, уменьшение их объема, патологическую (штопорообразную) извитость отростков, признаки кариопикноза и хроматолиза субстанции Ниссля, гомогенизацию цитоплазмы в некоторых нейроцитах с интенсификацией их окрашивания вследствие повышения проницаемости клеточных мембран. Среди таких патологически измененных нейроцитов часто выявляли тени погибших клеток (**рис. 2 цветной вкладки**).

Наряду с этим, вокруг очагов травматического повреждения в смежных и отдаленных отделах вещества мозга постоянно выявляли щелевидные расширения периваскулярных и перинейрональных пространств, что свидетельствовало о наличии диффузного отека ткани мозга. Признаки гидропического набухания выявляли также в цитоплазме астроцитов и олигодендроцитов, миелиновых волокнах белого вещества мозга (**рис. 3 цветной вкладки**). Кроме того, на всем протяжении ткани головного мозга животных группы *Контроль-2* отмечены признаки дистонического расширения сосудов микроциркуляторного русла с переполнением их элементами крови и стазом.

При оценке цитоархитектоники гиппокампа на серии срезов мозга животных во всех его зонах выявляли нейроциты с деформированной цитоплазмой и пикнотичными гиперхромными ядрами (**рис. 4 цветной вкладки**). Дистрофические изменения особенно выражены в большинстве нейронов С3-поля гиппокампа в виде гомогенизации и сморщивания цитоплазмы, редукции отростков и гипохромии ядер с краевой конденсацией хроматина. Появление патологически измененных клеток обуславливало дезорганизацию архитектоники гиппокампа крыс, перенесших тяжелую ЧМТ.

При морфологическом исследовании ткани мозга леченых животных (группа *Опыт*) по сравнению с контрольными на 10-е сутки после травмы структурные изменения были значительно менее выражены. При этом мягкие оболочки головного мозга на его конвексальной поверхности и основании на большем протяжении сохраняли обычную структуру. Лишь местами отмечено их незначительное отслоение с небольшим количеством эритроцитов. Субарахноидальные пространства свободны от форменных элементов крови и лишь местами содержат небольшое количество неизмененных эритроцитов.

Общая микроструктура коры и вещества мозга сохраняла характерную архитектуру при отсутствии распространенных очагов деструкции и геморрагического инфарктирования. Лишь местами обнаруживали небольшие остаточные зоны геморрагического размягчения вещества мозга, вокруг которых цитоструктура большинства нейроцитов сохранена (**рис. 5 цветной вкладки**). В отдельных из них отмечена гипохромия ядер и гомогенизация вещества цитоплазмы, что отражает обратимые дистрофические изменения. Наряду с этим, в ткани мозга опытных животных, по сравнению с контрольными, выявлена меньшая выраженность и распространенность реактивного отека-набухания вещества мозга (**рис. 6 цветной вкладки**).

По данным гистологического исследования гиппокампа у животных группы *Опыт* наблюдали почти

полное восстановление структуры большинства пирамидных нейроцитов.

Обсуждение результатов. Проведенные исследования показали, что применение у экспериментальных животных с тяжелой закрытой ЧМТ генной терапии, обеспечивающей индукцию синтеза в травмированной ЦНС изоформы $\epsilon 3$ апоЕ человека в ранние сроки после травмы, оказывает протекторное действие на сосудистую систему и паренхиму мозга, предотвращая образование зон вторичной дезинтеграции в травмированном мозге. Об этом свидетельствует значительное уменьшение (до следов) выраженности признаков нарушения проницаемости капилляров и повреждения клеток паренхимы мозга, реактивного отека мозга животных. Полученные результаты отражают реализацию выраженного протекторного эффекта генной терапии у крыс с ЧМТ.

Оценка эффективности использованного метода генной терапии основана на анализе результатов исследования временного и пространственного профиля морфологических изменений в головном мозге в ответ на экспериментальную ЧМТ. Кровь, излившаяся за пределы сосудистого русла, в течение острого периода травмы обуславливает возникновение в перифокальной нервной ткани, прилежащей к очагам кровоизлияния, воспалительно-некротических изменений, завершающихся глиозом и формированием кистозных полостей [18]. Помимо этого, не только при диффузном, но и строго локальном повреждении коры через некоторое время после ЧМТ отмечают гибель нейронов на значительном удалении от места первичной травмы. Исследования последнего десятилетия показали, что вторичное повреждение нейронов обусловлено апоптозом этих клеток, т.е. морфологическим проявлением процесса программируемой клеточной смерти (ПКС).

ПКС — это активный процесс смерти клеток, в котором клетка самостоятельно участвует в собственной гибели. ПКС представляет собой тонко регулируемое биологическое явление, для реализации которого требуется активация определенной генетической программы [8, 26]. В различных моделях экспериментальной ЧМТ у крыс и кролей выявлены признаки апоптоза уже через 2, 4 или 6 ч после травмы, которые достигали пика через 1–3 суток. ПКС подвергались нейроны, а также астроциты и олигодендроглиоциты в коре, прилежащей к зоне повреждения, а также на удалении от первичного очага — гомолатерально в гиппокампе, поясной извилине, субкортикальном белом веществе, а также в лобной доле, полосатом теле, мозжечке, зрительном бугре [9, 10, 14, 22, 23, 27, 28].

Особый интерес представляют данные о длительном и стойком сохранении признаков продолжающейся гибели клеток вследствие апоптоза в указанных регионах ЦНС после экспериментальной ЧМТ — через 7 суток [22, 28], 10 суток [23], 14 суток [14] и, что очень важно, в хроническом посттравматическом периоде — через 2 мес после травмы [10]. Течение апоптоза в поврежденной коре представляет собой двухфазный процесс с первым пиком количества апоптозных клеток через 24 ч после травмы и отсроченной, более выраженной апоптозной дегенерацией нервных клеток через 1 нед. Реализация программы

ПКС в нейронах, удаленных от очага первичного повреждения, подтверждает важную роль апоптоза в формировании вторичного повреждения и дисфункции мозга после экспериментальной ЧМТ [14].

Удобным объектом для изучения избирательно уязвимых отделов мозга при ЧМТ является гиппокамп, в котором уменьшение после травмы количества нейроцитов является четким критерием тяжести ЧМТ как у экспериментальных животных, так и у человека [6, 11, 13, 16]. В свою очередь, методы лечения, направленные на уменьшение гибели нейронов гиппокампа, улучшают функциональный исход травмы как в эксперименте, так и в клинике [15]. В ряде работ показана эффективность гистологического исследования гиппокампа в оценке действия различных методов медикаментозной и клеточной терапии при экспериментальной ЧМТ [12, 15, 21, 25]. В нашем эксперименте индукция синтеза в нервной ткани $\epsilon 3$ -изоформы апоЕ человека способствовала предупреждению вторичного повреждения мозга, регрессу структурных проявлений экспериментальной ЧМТ у крыс, а также повышению выживаемости нейронов гиппокампа.

Оценка тяжести повреждения гиппокампа при ЧМТ чрезвычайно важна, поскольку именно это образование во многом определяет состояние когнитивных функций индивидуума. Тяжелая и средней тяжести ЧМТ у человека часто обуславливает инвалидизацию при отсутствии грубых очаговых симптомов (нарушения движения, речи) вследствие расстройства тонких нейропсихических функций, приводящего к социальной дезадаптации пострадавшего. Дефицит когнитивных функций у больных связывают с часто выявляемым при ЧМТ повреждением гиппокампа [17]. Кроме того, установлена корреляция нарушений памяти с морфологическими изменениями в миндалевидных ядерных комплексах и дисэнцефальных структурах мозга. В частности, возникновение антероградной амнезии, т.е. нарушение памяти на текущие события после ЧМТ у человека, связывают с двусторонним повреждением СА1-отделов гиппокампа [29].

Результаты наших исследований показывают, что генная терапия, направленная на запуск синтеза в клетках ЦНС изоформы $\epsilon 3$ апоЕ человека при экспериментальной ЧМТ у крыс, способна предотвращать прогрессирование и углубление повреждений мозга, обеспечивая регресс как структурных изменений, так и обусловленных ими функциональных нарушений, а именно дефицита пространственной памяти и обучаемости [2, 4, 5]. С учетом приведенных сведений литературы наши результаты свидетельствуют об эффективности данного метода лечения ЧМТ и подтверждают перспективность использования генной терапии при травматическом повреждении мозга, а также указывают на необходимость проведения дальнейших исследований в этой области.

Выводы 1. Липосомная трансфекция клеток ЦНС плазмидным вектором, несущим ген изоформы $\epsilon 3$ апоЕ человека, обеспечивает протекторное действие на сосудистую систему и паренхиму головного мозга, тормозя развитие его вторичных повреждений при экспериментальной ЧМТ у крыс. Об этом свидетельствует уменьшение выраженности признаков нарушения проницаемости капилляров и повреждения

паренхимы мозга, реактивного отека мозга леченых животных.

2. Генная терапия является перспективным методом лечения ЧМТ в эксперименте. Дальнейшего изучения требуют механизмы терапевтического воздействия трансфекции ткани головного мозга геном АРОЕЗ на выраженность и динамику структурных и функциональных проявлений ЧМТ.

Список литературы

1. Белошицкий В.В. Основные направления применения генной терапии при черепно-мозговой травме // *Вісн. Укр. товариства генетиків і селекціонерів*. — 2005. — Т.3, №1-2. — С.15-20.
2. Белошицкий В.В., Педаченко Е.Г., Гридина Н.Я. и др. Генная терапия с использованием гена АРОЕЗ как метод коррекции посттравматических когнитивных нарушений в эксперименте // *Матеріали IV з'їзду нейрохірургів України*. — Дніпропетровськ, 2008. — С.204.
3. Педаченко Е.Г., Белошицкий В.В., Васильева И.Г. Аполипопротеин Е: физиологическая роль и возможная терапевтическая эффективность при черепно-мозговой травме // *Нейрохирургия*. — 2003. — №1. — С.59-65.
4. Biloshytsky V., Pedachenko E., Kvitnitskaya-Ryzhova T. et al. The effect of cationic liposome-mediated APOE3 in vivo gene transfer on hippocampal morphology and cognitive status following traumatic brain injury in rats: Abstracts of XVIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Brugge (Belgium, November 13-16, 2008) // *Hum. Gene Ther.* — 2008. — V.19, N10. — P.1126.
5. Biloshytsky V.V., Pedachenko E.G., Kvitnitskaya-Ryzhova T.Yu., Mikhalsky S.A. Cationic liposome-mediated APOE3 gene therapy attenuates cognitive impairment following traumatic brain injury in rats // *Proceedings of the conference «Mental recovery after traumatic brain injury: a multidisciplinary approach»*. — Moscow, 2008. — P.24.
6. Chen X. Glucocorticoids aggravate retrograde memory deficiency associated with traumatic brain injury in rats // *J. Neurotrauma*. — 2009. — V.26. — P.253-260.
7. Chen Y., Lomnitski L., Michaelson D.M., Shohami E. Motor and cognitive deficits in apolipoprotein E-deficient mice after closed head injury // *Neuroscience*. — 1997. — V.80, N4. — P.1255-1262.
8. Chopp M., Chan P.H., Hsu C.Y. et al. DNA damage and repair in central nervous system injury: National institute of neurological disorders and stroke workshop summary // *Stroke*. — 1996. — V.27, N3. — P.363-369.
9. Clark R.S., Chen J., Watkins S.C. et al. Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats // *J. Neurosci.* — 1997. — V.17, N23. — P.9172-9182.
10. Conti A.C., Raghupathi R., Trojanowski J.Q., McIntosh T.K. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period // *J. Neurosci.* — 1998. — V.18, N15. — P.5663-5672.
11. Doll H. Pharyngeal selective brain cooling improves neurofunctional and neurocognitive outcome after fluid percussion brain injury in rats // *J. Neurotrauma*. — 2009. — V.26. — P.235-242.
12. 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.
13. Jia F. Effect of post-traumatic mild hypothermia on hippocampal cell death after traumatic brain injury in rats // *J. Neurotrauma*. — 2009. — V.26. — P.243-252.
14. 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.
15. Kim B.-T., Rao V.L.R., Sailor K.A. et al. Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on hippocampal neurons after TBI // *J. Neurosurg.* — 2001. — V.95, N4. — P.674-679.
16. Kotapka M.J., Graham D.I., Adams J.H. et al. Hippocampal pathology in fatal human head injury without high intracranial pressure // *J. Neurotrauma*. — 1994. — V.11. — P.317-324.
17. LeVine S.M., Wetzel D.L. In situ chemical analyses from frozen tissue sections by Fourier transform infrared microspectroscopy: Examination of white matter exposed to extravasated blood in the rat brain // *Am. J. Pathol.* — 1994. — V.145. — P.1041-1047.
18. 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, N.Y.: Mary Ann Liebert, 1996. — P.105.
19. Lynch J.R., Pineda J.A., Morgan D. et al. Apolipoprotein E affects the central nervous system response to injury and the development of cerebral edema // *Ann. Neurol.* — 2002. — V.51, N1. — P.113-117.
20. 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.
21. 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.
22. Pohl D., Bittigau P., Ishimaru M.J. et al. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — V.96, N5. — P.2508-2513.
23. Runnerstam M., Bao F., Huang Y. et al. A new model for diffuse brain injury by rotational acceleration: II. Effects on extracellular glutamate, intracranial pressure, and neuronal apoptosis // *J. Neurotrauma*. — 2001. — V.18, N3. — P.259-273.
24. Sahuquillo J., Poca M.A., Amorós S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury // *Curr. Pharm. Des.* — 2001. — V.7, N15. — P.1475-1503.
25. 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. — Article 3.
26. Springer J.E., Nottingham S.A., McEwen M.L. et al. Caspase-3 apoptotic signaling following injury to the central nervous system // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2001. — V.39, N4. — P.299-307.
27. Yakovlev A.G., Knoblach 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.
28. 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.
29. 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 генної терапії на структурні пошкодження при черепно-мозковій травмі в експерименті

Белошицький В.В., Семенова В.М., Гридіна Н.Я., Цыба Л.О., Васильєва І.Г., Чопик Н.Г.

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

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

Вивчені можливості поліпшення наслідків черепно-мозкової травми (ЧМТ) в експерименті з використанням методу генної терапії, спрямованої на індукцію синтезу аполіпопротеїну Е (apoE)ε3 у тканині травмованого мозку. Тяжку ЧМТ наносили щурам під загальною анестезією шляхом вільного падіння вантажа масою 450 г з висоти 1,5 м. Внутрішньошлуночкова інфузія катіонних ліпосом DOTAP, що містили 25 мкг плазмідного вектору pCMV·SPORT6 з кДНК гену APOE3, здійснювали за допомогою осмотичних pomp ALZET. На 10-ту добу після травми оцінювали ефективність трансфекції методом RT-CRP; проводили гістологічне дослідження головного мозку. За допомогою RT-CRP підтверджено експресію гену APOE3 за наявності відповідної мРНК у зразках тканини головного мозку щурів. Ліпосомна трансфекція геном APOE3 тканини мозку щурів з ЧМТ забезпечувала протекторну дію на судинну систему і паренхіму мозку, попереджала формування зон вторинної дезинтеграції у травмованому мозку. Про це свідчило значне зменшення (до слідової) вираженості ознак порушення проникності капілярів і пошкодження паренхіми мозку, реактивного набряку мозку лікованих тварин.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, генна терапія, аполіпопротеїн Е, плазмідний вектор, катіонні ліпосоми.

Влияние генной терапии на структурные повреждения при черепно-мозговой травме в эксперименте

Белошицкий В.В., Семенова В.М., Гридина Н.Я., Цыба Л.А., Васильева И.Г., Чопик Н.Г.

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

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев

Изучены возможности улучшения исхода черепно-мозговой травмы (ЧМТ) в эксперименте с использованием метода генной терапии, направленной на индукцию синтеза аполипопротеина Е (apoE)ε3 в ткани травмированного мозга. Тяжелую ЧМТ наносили крысам под общей анестезией путем свободного падения груза массой 450 г с высоты 1,5 м. Внутривентрикулярную инфузию катионных липосом DOTAP, несущих 25 мкг плазмидного вектора pCMV·SPORT6 с кДНК гена APOE3, выполняли с помощью осмотических pomp ALZET. На 10-е сутки после травмы оценивали эффективность трансфекции методом RT-CRP; проводили гистологическое исследование головного мозга. С помощью RT-CRP подтверждена экспрессия гена APOE3 по наличию соответствующей мРНК в образцах ткани головного мозга крыс. Липосомная трансфекция геном APOE3 ткани мозга крыс с ЧМТ обеспечивала протекторное действие на сосудистую систему и паренхиму мозга, предотвращала формирование зон вторичной дезинтеграции в травмированном мозге. Об этом свидетельствовало значительное уменьшение (до следовой) выраженности признаков нарушения проницаемости капилляров и повреждения паренхимы мозга, реактивного отека мозга леченых животных.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, генная терапия, аполипопротеин Е, плазмидный вектор, катионные липосоми.

The influence of gene therapy on structural damage in case of traumatic brain injury in experiment

Beloshitsky V.V., Semenova V.M., Gridina N.Ya., Tsyba L.O., Vasilyeva I.G., Chopik N.G.

Institute of neurosurgery named after A.P. Romodanov of the AMS of Ukraine, Kiev

Institute of molecular biology and genetics of NAS of Ukraine, Kiev

Possibilities of improving traumatic brain injury (TBI) outcomes using gene therapy directed at apoEε3 synthesis induction in damaged brain tissue were studied in an experimental setting. A severe TBI was inflicted in rats under general anesthesia by a 450 g weight falling free from a height of 1.5 m. A mixture of DOTAP liposome and 25 μg of plasmid vector pCMV·SPORT6 with cDNA of APOE3 gene was infused into ventricles using ALZET pumps. On the 10th day following the TBI the transfection effectiveness was evaluated using RT-PCR; histological examination of the brain tissue was done. Applying the RT-PCR method corroborated the expression of APOE3 gene with corresponding mRNA presence in the samples of brain tissue. Liposome transfection of the rats' damaged brain by APOE3 protected the vascular system and brain parenchyma, and prevented the formation of secondary disintegration zones in the damaged brain. It was verified by a considerable reduction of signs of capillary permeability disturbance (almost to marks) and brain parenchyma damage, as well as reactive brain edema in animals under treatment.

Key words: traumatic brain injury, gene therapy, apolipoprotein E, plasmid vector, cationic liposome.

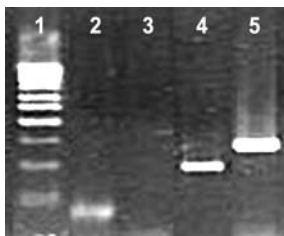


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК участка АРОЕ-гена: линия 1 — маркерная ДНК (100, 200 ... 1000 п.о.); линия 2 — нервная ткань интактных крыс (группа *Контроль-1*); линия 3 — нервная ткань «ложнооперированных» крыс (группа *Контроль-2*); линия 4 — нервная ткань крыс группы *Опыт* (трансфер гена АРОЕ3) — участок гена 180 п.о.; линия 5 — участок гена 295 п.о.

— нервная ткань крыс группы *Опыт* (трансфер гена АРОЕ3)
— участок гена 295 п.о.

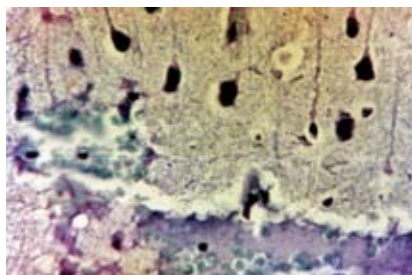


Рис. 2. Микрофото. Мозг крысы после ЧМТ. Вещество мозга вокруг кровоизлияния. Различные стадии дистрофических и некробиотических изменений нервных клеток. Окраска тионином. Ув.×800.

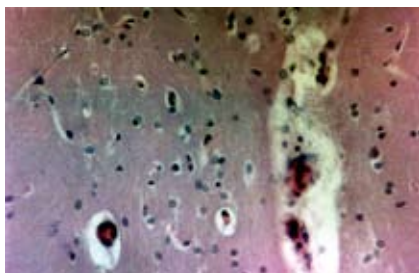


Рис. 3. Микрофото. Признаки периваскулярного и перичеселлюлярного отека в белом веществе мозга крысы после ЧМТ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.×200.

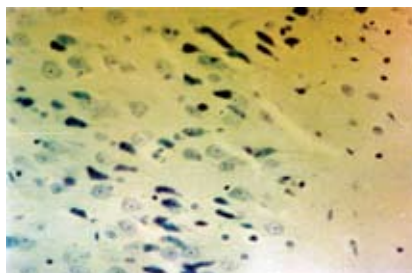


Рис. 4. Микрофото. Дистрофические изменения в пирамидных клетках зоны С3 гиппокампа крысы после ЧМТ. Окраска тионином. Ув.×400.

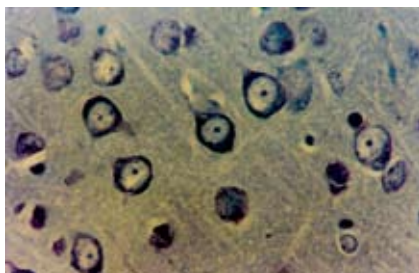


Рис. 5. Микрофото. Сохранность структуры нейронов коры большого мозга крыс с ЧМТ после лечения (липосомная трансфекция с трансфером гена АРОЕ3 человека). Окраска тионином. Ув.×800.

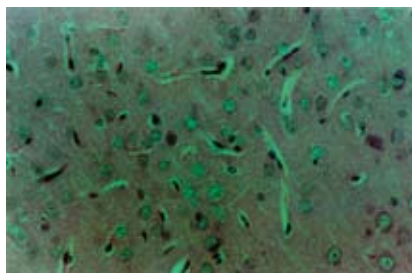


Рис. 6. Микрофото. Незначительно выраженный перикапиллярный и перичеселлюлярный отек мозга крыс с ЧМТ после лечения (липосомная трансфекция с трансфером гена АРОЕ3 человека). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.×400.

Комментарий

к статье Белошицкого В.В., Семеновой В.М., Гридиной Н.Я. и соавт. «Влияние генной терапии на структурные повреждения при черепно-мозговой травме в эксперименте».

Данная статья существенно отличается от многих статей, посвященных ЧМТ, во-первых, разработкой новой модели «ударного ускорения» травмы мозга, во-вторых, попыткой применить генно-терапевтические подходы для коррекции возникающих последствий ЧМТ. В качестве последней была выбрана кодовая ДНК гена АРОЕ-3 в генном векторе р.ИС18, которая вводилась внутривентрикулярно. Все это свидетельствует о новом качественном этапе в изучении патогенеза и экспериментальной терапии ЧМТ и актуальности проблемы.

Статья начинается кратким современным обзором по проблеме моделирования ЧМТ и экспериментальной ее терапии. Детально описаны методы исследования и манипуляции с введением препарата в желудочковую систему мозга.

В разделе «Результаты исследования» в основном представлены лишь морфологические данные без сопоставления с молекулярно-генетическими исследованиями. Показано, что применение кДНК гена АРОЕ приводит на основании гистологических исследований к существенным улучшениям по сравнению с животными с ЧМТ без лечения. Завершается статья обсуждением и выводами. К этому разделу статьи есть некоторые замечания патофизиологического плана, а именно, во-первых, каким образом липосомная конструкция, содержащая ген АРОЕ, введенная в желудочек крысы, влияет (предупреждает) развитие отека, нарушение микроциркуляции, «меньшей выраженности структурных изменений», сохранению обычной структуры мягких оболочек мозга.

Во-вторых, ген АРОЕ ответственный за транспорт холестерина и липидов, которые имеют весьма отдаленное отношение к посттравматическому отеку, геморрагиям, раннему и отсроченному апоптозу нервных клеток, в статье не приведены данные литературы по указанным процессам.

При дальнейших исследованиях авторам целесообразно обратить внимание на следующие патофизиологические и биохимические аспекты травмы:

1. Какая воспроизводимость и однотипность изменений в мозге при травме в разные сроки, желательно исследовать через 24 часа, 3-4 суток, 10 суток. Известно, что разная тяжесть травмы у животных нивелирует эффект лечения.

2. Путь введения и вид препарата. Ну ввели в желудочки мозга липосомы с препаратом, ну и что с этого? История изучения липосомных капсул имеет почти 50-летнюю историю, вводили химиопрепараты, иммуномодуляторы, разные фармпрепараты и, к сожалению, метод липосомной формы доставки оказался недостаточно эффективным, и «не прижился» в медицине. Введение липосом в желудочки мозга, куда они оттуда уходят, как они действуют дальше, каким образом они проникают в нервные клетки через эндимарную оболочку желудочков?

3. Известно, что апополипротеид Е имеет определенную функцию, и каким образом он влияет на отек, геморрагии, некроз и апоптоз клеток гиппокампа. Кроме того, нужно доказать, что у крыс после травмы имеется «недостаток» дефицит своего апополипротеида и его нужно восполнить внешним липопротеидом, и в каких областях мозга выявляется это снижение уровня этого вещества.

4. Целесообразно методом ПЦР выявить, в каких областях мозга идет синтез мРНК после внутривентрикулярного введения и как долго этот синтез мРНК существует, 1 час, 1 день или 1 год.

Подобных вопросов возникает много, но они носят больше теоретический и патофизиологический характер и не умаляют значения данной статьи.

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