

УДК 616.831-001-036.17:616.1/.9-055.5/7-092]-085-092.9.259

Білошицький В.В., Михальський С.А., Квітницька-Рижова Т.Ю.

Вплив ліпосомальної трансфекції клітин головного мозку геном апоЕ3 на пошкодження аксонів, зумовлене експериментальною черепно-мозковою травмоюІнститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України,
Інститут геронтології ім. акад. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України, м. Київ

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) є однією з основних причин смертності й інвалідизації в індустріально розвинених країнах і країнах, що розвиваються [1]. Поліпшення результатів лікування наслідків ЧМТ досягнуте завдяки успіхам у розвитку інтенсивної терапії, нейрохірургічної техніки та реабілітації [2]. Наступним кроком має бути розробка ефективної фармакотерапії ЧМТ, проте, у більшості клінічних досліджень у цьому напрямку бажана мета не досягнута [1].

Серед структурних змін нервової тканини при ЧМТ особливе значення має пошкодження аксонів, яке проявляється через різні строки після травми, залежно від моделі травми, її інтенсивності та виду експериментальної тварини. Вторинну аксотомію в експериментальних тварин виявляють у середньому через 2–6 год після травми мозку [3].

Терміном “дифузне аксональне пошкодження” (ДАП) визначають поширену деструкцію трактів білої речовини головного мозку, що справляє значний вплив на неврологічний дефіцит у потерпілих з ЧМТ [4]. ДАП при ЧМТ пов’язане з гіршими наслідками травми і збільшенням витрат системи охорони здоров’я. Це робить актуальним дослідження патогенезу ДАП і можливостей лікувального впливу на цей стан [5].

Метою роботи було вивчення пошкодження структури аксонів за тяжкої ЧМТ в експерименті, а також можливостей корекції патологічних змін з використанням методу генної терапії, спрямованої на індукцію синтезу в нервовій тканині ізоформи ε3 аполіпопротеїну Е (АпоЕ3 означає білок; апоЕ3 означає ген).

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведено на дорослих (віком 6–8 міс) щурах-самцях лінії Wistar, маса тіла від 350 до 400 г, розведення віварію Інституту нейрохірургії. Тварини розподілені на 4 групи:

– *K* — група інтактних тварин (5).

– *Пл* — тваринам в лівий бічний шлуночок встановлювали канюлю, яку з’єднували з введеним під шкіру резервуаром (осмотичною помпою ALZET), для внутрішньошлуночкової інфузії катіонних ліпосом з плазмідним вектором, який ніс ген апоЕ3 (5).

– *ЧМТ* — група тварин з експериментальною ЧМТ (5).

– *ЧМТ+Пл* — у тварин моделювали ЧМТ і встановлювали в лівий бічний шлуночок канюлю, з’єднували її з введеним під шкіру резервуаром (осмотичною помпою ALZET) для внутрішньошлуночкової інфузії катіонних ліпосом з плазмідним вектором, який ніс ген апоЕ3, у післятравматичному періоді (6).

Тяжкої ЧМТ завдавали щурам шляхом вільного падіння вантажу масою 450 г з висоти 1,5 м. Моделювання експериментальної ЧМТ і всі хірур-

гічні маніпуляції виконували під наркозом шляхом внутрішньошлуночкової введення розчину каліпсолау в дозі 0,7 мг/кг. Як лікувальний препарат досліджували комплекс катіонних ліпосом DOTAP Methosulfate (виробництва Sigma-Aldrich, США) і 25 мкг плазмідного вектору рCMV·SPORT6 (виробництва Invitrogen, США), що містив ген апоЕ3, під контролем цитомегаловірусного промотора.

Для морфологічного дослідження через 10 діб після травми та/або введення плазмідного вектору тварин умертвляли шляхом внутрішньочеревного введення розчину тіопентал-натрію (200 мг/кг). Для електронно-мікроскопічного дослідження вирізували тонкі фронтальні зрізи (завтовшки 0,5 мм) в ділянці гіпокампа, які фіксували у 2,5% розчині глутаральдегіду протягом 6 год при температурі 4°C. Після цього шматочки промивали у фосфатному буфері (рН 7,4) протягом 2 год і дофіксували протягом 2 год в 1% розчині OsO₄ на фосфатному буфері (рН 7,4). Подальше зневоднення у спиртах (70% етанол містив 2% уранілацетату) та ацетоні, а також заливання в смолу (епон-аралдитна суміш) здійснювали за загальноприйнятою методикою. Виготовляли фронтальні напівтонкі зрізи (завтовшки 1 мкм) ділянки гіпокампа, які вміщували на предметне скло в краплю 5% водного розчину ацетону, висушували й фарбували толуїдиновим синім. Ультратонкі зрізи (товщиною 60–70 нм) контрастували у 2% розчині уранілацетату й цитрату свинцю, досліджували під електронним мікроскопом ПЕМ-125К (“Selmi”, Україна) при прискорювальній напрузі 60 кВ.

Отримані електронно-мікроскопічні мікрофотографії зони гіпокампа використовували для визначення частки ушкоджених мієлінових волокон. Для цього на площі мікрофото (розмір 6×9 см) обчислювали загальну кількість аксонів і кількість аксонів з ознаками ушкодження. Частку ушкоджених мієлінових волокон обчислювали за формулою:

(кількість аксонів з ознаками ушкодження / загальна кількість аксонів)×100%. Кількість мікрофотографій, на яких здійснювали підрахунки, становила від 50 до 100 на одну тварину.

Статистична обробка отриманих результатів проведена за допомогою пакета “Statistica 5.5” з використанням непараметричних методів оцінки даних. Оцінювали нормальність розподілу ознак за кожним з отриманих варіаційних рядів, середні значення за кожною ознакою, що вивчали, та стандартні відхилення. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерію Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення. Як показано нами у попередніх дослідженнях [6], тяжка дифузна ЧМТ у щурів на 10-ту добу після її нанесення характеризується ураженням такого чутливого відділу

головного мозку, як гіпокамп. За даними світлооптичного та електронно-мікроскопічного дослідження при ЧМТ виявлені значні зміни цитоархітекtonіки гіпокампа з ушкодженням всіх елементів мозку (нейронів, глії, капілярів): ділянки випадіння нейронів (нейрональна депопуляція гіпокампа); гідропічні порушення, що проявлялися набряком, насамперед, перикапілярних астрогліальних структур; реактивний гліоз; ознаки активації мікроглії та запальної реакції, а також дистрофічні зміни, представлені значним накопиченням ліпофусцину й залишкових тілець в нейронах та гліоцитах.

Ушкодження структури гіпокампа корелюють з наявністю значного когнітивного дефіциту, що характеризується стійкою антероградною амнезією, а саме, зниженням в посттравматичному періоді просторової пам'яті, здатності до навчання, вираженими порушеннями дослідницької поведінки й емоційного стану тварин, що відображує наявність підвищеного рівня стресу й тривожності [7, 8].

При ЧМТ глибокі ультраструктурні зміни виявляли не лише в перикаріонах, а й у відростках нервових клітин. Відзначене пошкодження більш ніж 30% мієлінових волокон (*рис. 1*). Характерною реакцією є ушкодження аксонів у вигляді їх локального набряку, деформації осового циліндра, його облітерації, а в даних спостереженнях — відшарування від мієлінової оболонки; утворення між осовим циліндром і мієліном великих вакуолей (*рис. 2, 3*). Це поєднувалося з дезінтеграцією, гомогенізацією і деструкцією внутрішньоклітинних структур нейритів. Спостерігали виражені зміни цитоскелету — ушкодження нейрофіламентів, локальну, рідше — повну втрату мікротрубочок, що спричиняло порушення аксонального транспорту. Суттєві зміни виявлені у мітохондріях — на тлі гіпертрофії деяких органел відзначали ознаки дискмплексації їх крист, а також значний набряк, аж до утворення вакуолей. При цьому досить часто виявляли виражені порушення мієлінових оболонок у вигляді їх розшарування, дезагрегації, порушення ламелярної структури, формування здуттів і випинань. Крім того, спостерігали деструктивні зміни деяких синапсів.

При застосуванні генної терапії шляхом внутрішньошлуночкового введення катіонних ліпосом з плазмідним вектором, що несе ген апоЕ3 (група ЧМТ+Пл), відзначено меншу інтенсивність та поширення деструктивно-дистрофічних змін, зумовлених ЧМТ. Зокрема, структура аксонів у групі ЧМТ+Пл була пошкоджена меншою мірою, ніж при ЧМТ (*рис. 4*). Нормалізація стосувалась як структури осового циліндра, його цитоскелету та мітохондрій, так і структури мієлінових оболонок. Рідше виявляли набряк та деформацію аксонів. Частка пошкоджених мієлінових волокон становила 22%, тоді як в у групі ЧМТ — 35% (*див. рис. 1*).

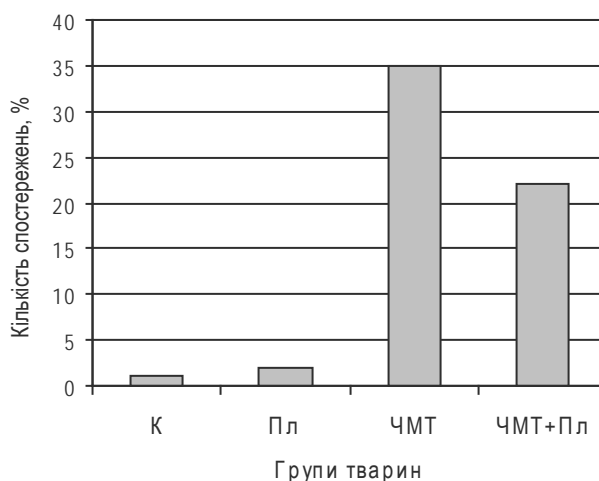


Рис. 1. Частота пошкодження мієлінових волокон у гіпокампі щурів з ЧМТ.

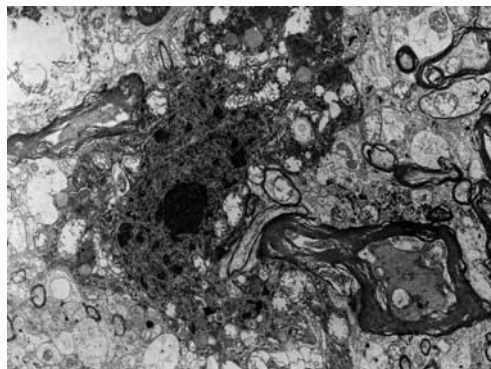


Рис. 2. Електроннограма. Деструктивно змінений олігодендрогліцит в оточенні ушкоджених мієлінованих аксонів з вираженими деструктивними змінами як осових циліндрів, так і мієлінових оболонок (36.×1600).

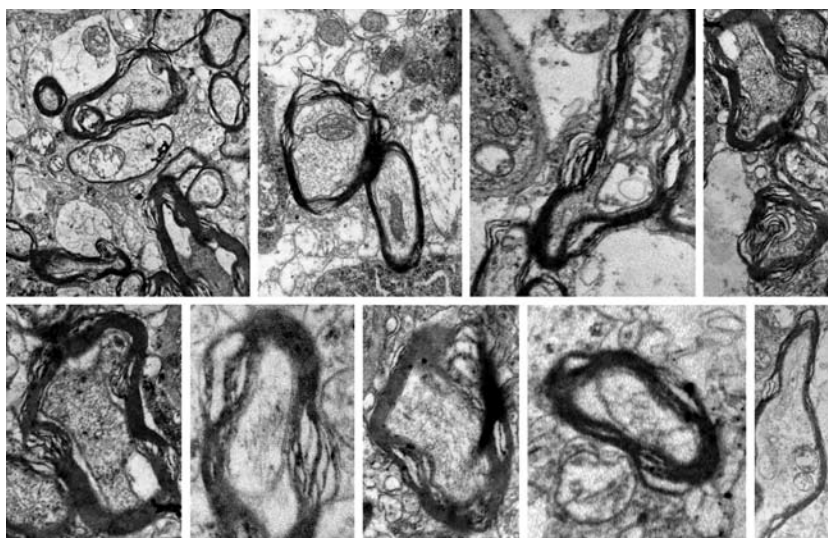


Рис. 3. Електроннограма. Ділянки нейропілю зони гіпокампа щурів з ЧМТ. Деструкція осових циліндрів та мієлінових оболонок аксонів різного ступеня. Деформація осових циліндрів, локальний набряк, порушення цитоскелету, набряк гіпертрофованих мітохондрій аж до формування вакуолей, розшарування мієлінових оболонок.

Як правило, ДАП вважають наслідком прискорення/уповільнення при травмі, що зумовлює поширене пошкодження мозку у вигляді невеликих петехіальних крововиливів, які виявляють за даними комп'ютерної томографії, а також масивного порушення цитоскелету аксонів — за даними гістологічних та імуногістохімічних досліджень. Раніше ДАП вважали компонентом тільки тяжкої ЧМТ, проте, результати досліджень свідчили, пошкодження аксонів відбувається за будь-якого типу травми мозку, не тільки дифузної, а й вогнищевої, його виявляють більш ніж у 90% спостережень ЧМТ [9, 10]. Сьогодні встановлено, що ДАП виявляють у 25–30% потерпілих, які померли після тяжкої ЧМТ, а також у тих, у кого після ЧМТ виник вегетативний стан або тяжка інвалідизація (відповідно у 4 і 15%) [11]. Пошкодження аксонів є також основою порушення функції регуляторної формації, яке вважають причиною виникнення коматозних станів за тяжкої ЧМТ [12].

Раніше пошкодження цитоскелету аксонів вважали швидким наслідком передачі зсувної деформації (“shearing”) речовиною мозку. Зараз вважають, що анатомічний розрив аксонів внаслідок первинної травми виникає рідко [3]. Первинна аксотомія є наслідком тяжкої, переважно ротаційної, травми мозку, яка спричиняє порушення цілісності аксонів та їх набряк. Проте, встановлені механізми, які зумовлюють прогресуюче відстрочене ураження білої речовини, при тому не є безпосереднім наслідком впливу сили, прикладеної в момент травми. Більшість нейронів втрачають цілісність відростків, тобто зазнають вторинної аксотомії, у пізніші строки [13]. Критичним компонентом прогресування вторинного ушкодження є порушення гомеостазу кальцію. Після травми підвищується проникність мембран, що зумовлює входження в аксони позаклітинного Ca^{2+} [14]. Навантаження кальцієм зумовлює швидке набрякання мітохондрій аксонів, деполяризацію їх мембран, відкриття пор мітохондріальних мембран і вивільнення чинників, що ініціюють програмовану смерть клітин [15, 16]. Наслідком підвищення концен-

трації Ca^{2+} в аксонах є також активація ферментів, які розщеплюють основні структурні білки, відповідальні за підтримку форми аксонів та аксонального транспорту. Це, зрештою, спричиняє акумуляцію транспортованих протеїнів, набухання аксонів і, в остаточному підсумку, їх дезінтеграцію [3]. Зокрема, доведено активацію кальпаїн-залежного [17] та каспаза-залежного [18] шляхів протеолізу.

З огляду на зазначене, зрозуміла провідна роль ДАП у формуванні якості життя потерпілих після як тяжкої, так і легкої ЧМТ. Після тяжкого ушкодження порушуються важливі тракти білої речовини, що, навіть за нормального внутрішньочерепного тиску, стає причиною смерті чи формування вегетативного стану. За легкої травми ураження білої речовини може зумовити появу стійких нейро-когнітивних симптомів [4].

Як ми повідомляли раніше, ліпосомальна трансфекція тканини головного мозку плазмідним вектором з геном апоЕ3 позитивно впливає на структуру й ультраструктуру гіпокампа: зменшує ЧМТ-індуковану загибель нейронів, поліпшує їх якісний склад, вираженість реактивного гліозу і перикапілярного набряку, мікрогліальну активацію та запальні реакції, накопичення ліпофусцину [6]. Це супроводжується прискоренням регресу неврологічних симптомів та когнітивного дефіциту в експериментальних тварин [7, 8].

Результати нашого дослідження свідчать, що АпоЕ3, додатковий синтез якого в нервовій тканині індукований шляхом генної терапії, може справляти позитивний лікувальний ефект, зокрема, завдяки зменшенню вираженості ДАП при ЧМТ. Точні механізми, за допомогою яких АпоЕ забезпечує обмеження структурних проявів і функціональних наслідків ЧМТ, недостатньо вивчені, хоча можливими поясненнями можуть бути вплив на нейрогенез, запальну відповідь, процесінг А β і метаболізм нейронів [19]. Дослідження останніх років показали, що АпоЕ3, зв'язуючись з білком рецептору ліпопротеїнів низької щільності (low-density lipoprotein receptor-related protein), гальмує апоптоз нейронів через включення шляху внутрішньоклітинної сигналізації, що передбачає активацію протеїнкінази С δ та інактивацію глікогенсинтазної кінази β [20]. Використання технології Microarray у мишей з ЧМТ дозволило визначити геномну відповідь гіпокампа на травму залежно від апоЕ-генотипу. Доведено, що у тварин з апоЕ3-генотипом посилюється експресія 621 гена, знижується — 86; у мишей з генотипом апоЕ4, який пов'язують з менш ефективною відповіддю нервової тканини на травму — відповідно 207 і 74 генів. Зміни експресії стосувались груп генів, що регулюють рухомість клітин, морфологію тканин, імунну відповідь, міжклітинну сигналізацію та взаємодію, запальну відповідь,

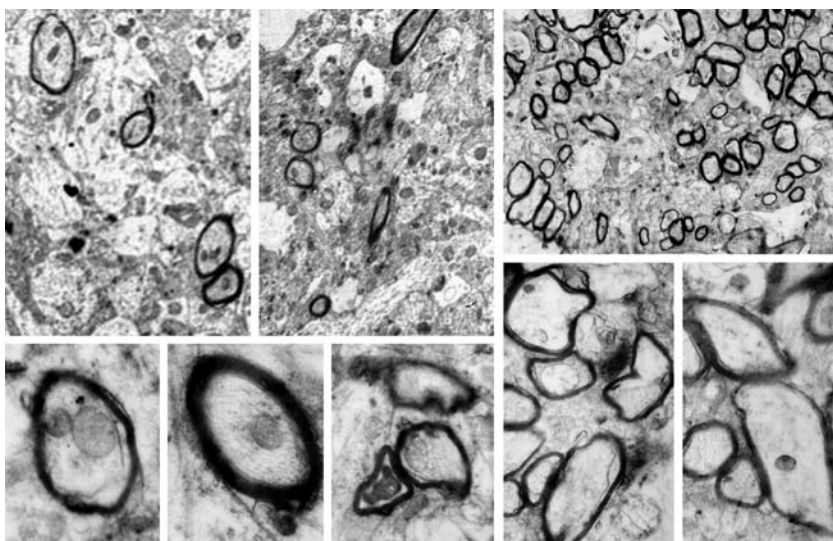


Рис. 4. Електроннограма. Нормалізуючий вплив генної терапії на структуру мієлінізованих аксонів зони гіпокампа.

ріст клітин та проліферацію, метаболізм ліпідів і смерть клітин [19].

Беручи до уваги дані літератури, результати наших досліджень свідчать про ефективність внутрішньошлуночкового введення катіонних ліпосом з плазмідним вектором, що несе ген апоЕ3, при ЧМТ, підтверджують перспективність використання генної терапії за травматичного ураження мозку, а також вказують на необхідність проведення подальших досліджень у цьому напрямку.

Висновки

1. Тяжка ЧМТ в експерименті характеризується порушенням цитоархітекτονіки гіпокампа з формуванням деструктивно-дистрофічних змін усіх елементів мозку (нейронів, глії, капілярів). Характерною ознакою такого ураження є ДАП, що проявляється глибокими порушеннями цитоскелету аксонів, набряком, деструкцією мітохондрій, а також тяжким ушкодженням мієлінових оболонок.

2. Ліпосомальна трансфекція клітин головного мозку плазмідним вектором, що несе ген ізоформи ε3 апоЕ людини, забезпечує при експериментальній ЧМТ зменшення тяжкості та вираженості ДАП. Це корелює з позитивним впливом на структуру й ультраструктуру нейронів гіпокампа, зменшенням тяжкості реактивного гліозу і перикапілярного набряку, вираженості мікрогліальної активації та запальних реакцій, накопичення ліпофусцину.

3. Аполіпопротеїн Е, додатковий синтез якого в нервовій тканині індукований шляхом генної терапії, може справляти позитивний лікувальний ефект при ЧМТ, зокрема, завдяки зменшенню ДАП головного мозку.

Список літератури

1. Clinical trials in head injury / R.K. Narayan, M.E. Michel, B. Ansell [et al.] // *J. Neurotrauma*. — 2002. — V.19, N5. — P.503–557.
2. Johnston A.J. Advanced monitoring in the neurology intensive care unit: microdialysis / A.J. Johnston, A.K. Gupta // *Curr. Opin. Crit. Care*. — 2002. — V.8, N2. — P.121–127.
3. Maxwell W.L. A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review / W.L. Maxwell, J.T. Povlishock, D.L. Graham // *J. Neurotrauma*. — 1997. — V.14. — P.419–440.
4. Park E. Traumatic brain injury: Can the consequences be stopped? / E. Park, J.D. Bell // *C.M.A.J.* — 2008. — V.178, N9. — P.1163–1170.
5. Wang H.-C. Experimental models of traumatic axonal injury / H.-C. Wang, Y.-B. Ma // *J. Clin. Neurosci.* — 2010. — V.17. — P.157–162.
6. Влияние трансфекции гена аполипопротеина Е человека на структуру гиппокампа и когнитивные нарушения после черепно-мозговой травмы у крыс разного возраста / С.А. Михальский, В.В. Белошицкий, Л.А. Цыба [и др.] // *Пробл. старения и долголетия*. — 2008. — Т.17, №2. — С.240–258.
7. Влияние липосомальной трансфекции гена аполипопротеина Е3 на динамику неврологического и когнитивного дефицита при черепно-мозговой травме в эксперименте / В.В. Белошицкий, Н.Я. Гридина, Цыба Л.А., Величко О.Н. // *Укр. нейрохірург. журн.* — 2009. — №2. — С. 59–60.
8. Вплив ліпосомальної трансфекції в клітини головного мозку гену апоЕ3 на дослідницьку поведінку та емоційний стан щурів після експериментальної черепно-мозгової травми / В.В. Білошицький, О.М. Величко, Н.Я. Гридіна [та ін.] // *Укр. нейрохірург. журн.* — 2010. — №2. — С.55–62.
9. Acute subdural hematoma and diffuse axonal injury after severe head trauma / J. Sahuquillo-Barris, J. Lamarca-Ciuro, J. Vilalta-Castan [et al.] // *J. Neurosurg.* — 1988. — V.68. — P.894–900.
10. Axonal injury: a universal consequence of fatal closed head injury? / S.M. Gentleman, G.W. Roberts, T.A. Genarelli [et al.] // *Acta Neuropathol. (Berl.)*. — 1995. — V.89. — P.537–543.
11. Reinert M.M. Clinical trials in head injury / M.M. Reinert, R. Bullock // *Neurol. Res.* — 1999. — V.21. — P.330–338.
12. Immediate coma following inertial brain injury dependent on axonal damage in the brainstem / D.H. Smith, M. Nonaka, R. Miller [et al.] // *J. Neurosurg.* — 2000. — V.93. — P.315–322.
13. Ultrastructural evidence of axonal shearing as a result of lateral acceleration of the head in non-human primates / W.L. Maxwell, C. Watt, D.I. Graham [et al.] // *Acta Neuropathol. (Berl.)*. — 1993. — V.86. — P.136–144.
14. Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels / J.A. Wolf, P.K. Stys, T. Lusardi [et al.] // *J. Neurosci.* — 2001. — V.21. — P.1923–1930.
15. Buki A. All roads lead to disconnection? Traumatic axonal injury revisited / A. Buki, J.T. Povlishock // *Acta Neurochir. (Wien)*. — 2006. — V.148. — P.181–194.
16. Toxic proteins released from mitochondria in cell death / X. Saelens, N. Festjens, L. Vande Walle [et al.] // *Oncogene*. — 2004. — V.23. — P.2861–2874.
17. The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury / A. Buki, R. Siman, J.Q. Trojanowski, J.T. Povlishock // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* — 1999. — V.58. — P.365–375.
18. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain injury / R.W. Keane, S. Kraydieh, G. Lotocki [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2001. — V.21, N10. — P.1189–1198.
19. Apolipoprotein E-genotype dependent hippocampal and cortical responses to traumatic brain injury / F. Crawford, M. Wood, S. Ferguson [et al.] // *Neuroscience*. — 2009. — V.159. — P.1349–1362.
20. Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1 / H. Hayashi, R. B. Campenot, D.E. Vance, J.E. Vance // *J. Neurosci.* — 2007. — V.27, N8. — P.1933–1941.

Одержано 24.02.2011

Білошицький В.В., Михальський С.А., Квітницька-Рижова Т.Ю.

Вплив ліпосомальної трансфекції клітин головного мозку геном апоЕ3 на пошкодження аксонів, зумовлене експериментальною черепно-мозковою травмою

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України,
Інститут геронтології ім. акад. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України, м. Київ

Вивчені ушкодження структури аксонів за тяжкої черепно-мозкової травми (ЧМТ) в експерименті, а також можливості корекції патологічних змін з використанням методу генної терапії, спрямованої на індукцію синтезу в нервовій тканині ізоформи ε3 аполіпопротеїну Е. Тяжкої дифузної 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 рCMV·SPORT6 з кДНК гену АРОЕ3, здійснювали за допомогою осмотичних pomp ALZET. Тяжка ЧМТ в експерименті характеризується порушенням цитоархітектоніки гіпокампа з формуванням деструктивно-дистрофічних змін усіх елементів мозку (нейронів, глії, капілярів). Характерною ознакою такого ураження є дифузне аксональне пошкодження, що проявляється глибокими порушеннями їх цитоскелету, набряком та деформацією, деструкцією мітохондрій, а також тяжким пошкодженням мієлінових оболонок. Ліпосомальна трансфекція головного мозку плазмідним вектором, що несе ген ізоформи ε3 аполіпопротеїну Е, справляє позитивний лікувальний вплив при ЧМТ, зокрема, внаслідок зменшення дифузного аксонального пошкодження головного мозку.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, дифузне аксональне пошкодження, генна терапія, аполіпопротеїн Е, ультраструктура, експеримент.

Белошицкий В.В., Михальский С.А., Квитницкая-Рыжова Т.Ю.

Влияние липосомальной трансфекции клеток головного мозга геном апоЕ3 на повреждение аксонов, обусловленное экспериментальной черепно-мозговой травмой

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України,
Інститут геронтології ім. акад. Д.Ф. Чеботарева НАМН України, г. Київ

Изучены повреждения структуры аксонов при тяжелой черепно-мозговой травме (ЧМТ) в эксперименте, а также возможности коррекции патологических изменений с использованием метода генной терапии, направленной на индукцию синтеза в нервной ткани изоформы ε3 аполипопротеина Е. 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 рCMV·SPORT6 с кДНК гена АРОЕ3, осуществляли с помощью осмотических pomp ALZET. Тяжелая ЧМТ в эксперименте характеризуется нарушением цитоархитектоники гиппокампа с формированием деструктивно-дистрофических изменений всех элементов мозга (нейронов, глии, капилляров). Характерной чертой такого поражения является диффузное аксональное повреждение, проявляющееся глубокими нарушениями их цитоскелета, отеком и деформацией, деструкцией митохондрий, а также тяжелым повреждением миелиновых оболочек. Липосомальная трансфекция головного мозга плазмидным вектором, несущим ген изоформы ε3 аполипопротеина Е, оказывает положительный лечебный эффект при ЧМТ, в том числе вследствие уменьшения диффузного аксонального повреждения головного мозга.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, диффузное аксональное повреждение, генная терапия, аполипопротеин Е, ультраструктура, эксперимент.

Biloshytsky V.V., Mikhalsky S.A., Kvitnitskaya-Ryzhova T.Yu.

Influence of liposome-mediated APOE3 gene transfection of brain tissue on diffuse axonal injury, caused by traumatic brain injury, in experiment

Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov
of National Academy of Medical Sciences of Ukraine,
Institute of Gerontology named after acad. D.F. Chebotaryov
of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

The goal of study was to estimate the structural damage of axons in rats with severe traumatic brain injury (TBI), and the possibilities of such disorders correction by means of gene therapy that launches the synthesis of $\epsilon 3$ isoform of apolipoprotein E in brain tissue. Severe diffuse TBI in rats was inflicted under overall anesthesia by free load weighing 450 g, falling from a 1.5 m elevation. The mixture of DOTAP liposome and 25 μg of plasmid vector pCMV \cdot SPORT6 with cDNA of APOE3 gene was infused intraventricularly using ALZET osmotic pumps. Severe experimental TBI is characterized by the damage of hippocampal cytoarchitectonics with destructive-dystrophic changes of all brain elements (neurons, glia, capillaries). The distinguishing feature of this damage is diffuse axonal injury exhibited by pronounced changes of axonal cytoskeleton, axonal edema and deformity, mitochondrial destruction and serious damage to myelin sheathes. The liposome-mediated brain tissue transfection with plasmid vector carrying the gene of $\epsilon 3$ isoform of apolipoprotein E has a positive therapeutic effect after TBI including the decrease of diffuse axonal injury.

Key words: *traumatic brain injury, gene therapy, apolipoprotein E, diffuse axonal injury.*

Коментар

до статті В.В. Білошицького та співавторів "Вплив ліпосомальної трансфекції клітин головного мозку геном апоЕ3 на пошкодження аксонів, зумовлене експериментальною черепно-мозковою травмою"

Дослідження патогенезу черепно-мозкового ушкодження і розробка сучасних, більш ефективних методів лікування цієї патології є актуальною проблемою сучасної медицини. Незважаючи на появу нових підходів до лікування черепно-мозкової травми (ЧМТ), результати лікування та наслідки тяжкої ЧМТ не задовольняють пацієнтів і лікарів. За даними літератури, частота неврологічних і когнітивних порушень при ЧМТ значною мірою зумовлена тяжкістю пошкодження аксонів і, відповідно, дисфункцією нейрональних мереж.

В основу пропонованого дослідження покладені сучасні уявлення про біохімічні та молекулярні каскади вторинного ушкодження головного мозку, які залежать від експресії або активації відповідних генів чи білків. Вважають, що зсув у балансі між пошкоджуючими та захисними білковими факторами в бік експресії сполук, що індукують смерть клітин, визначає тяжкість ЧМТ і

глибину неврологічного дефіциту.

З огляду на зазначене, проведене авторами комплексне дослідження структурних характеристик експериментальної ЧМТ, зокрема морфометричних та ультраструктурних досліджень ушкодження аксонів, а також можливостей корекції патологічних змін за допомогою нового методу лікування — генної терапії з переносом гену АРОЕ3, здійснено на сучасному методичному рівні та має безперечну наукову новизну. Саме аполіпопротеїн Е, за сучасними уявленнями, відіграє захисну роль при різних видах патології центральної нервової системи, проявляючи здатність модифікувати реакції мікрогліальних клітин на ЧМТ та сприяти захисту нервових клітин від ексайтотоксичного ураження.

Результати дослідів, отримані під час вивчення цього питання, сприятимуть розробці нових методів лікування ЧМТ як в експериментальній, так і клінічній практиці.

*О.Г. Ніконенко, доктор біол. наук,
провідний науковий співробітник Відділу цитології,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця*