

УДК 591.481.1:616-001-092.9.259:616.1/.9-055.5/.7-092]-085

Білошицький В.В.¹, Михальський С.А.², Гридїна Н.Я.³, Квітницька-Рижова Т.Ю.², Педаченко Є.Г.¹¹ Відділ травми центральної нервової системи, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ, Україна² Лабораторія морфології і цитології, Інститут геронтології ім. акад. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України, м. Київ, Україна³ Лабораторія експериментальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ, Україна

Структурно-функціональна характеристика пошкодження нейронів гіпокампа при експериментальній черепно-мозковій травмі і генній терапії з використанням гену апоЕ3

Вступ. Досліджені морфологічні зміни нейронів гіпокампа та його функціональна характеристика за тяжкої черепно-мозкової травми (ЧМТ) в експерименті, оцінена терапевтична ефективність генної терапії, спрямована на індукцію синтезу у нервовій тканині ізоформи ε3 аполіпропротеїну Е.

Матеріали і методи. Тяжку дифузну ЧМТ моделювали у щурів під загальним знеболенням 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 κДНК гену апоЕ3, здійснювали за допомогою осмотичних помп ALZET.

Результати. Характерними ознаками тяжкої ЧМТ у щурів є депопуляція нейронів гіпокампа, порушення його цитоархітекtonіки, значні зміни якісних характеристик нейронів, зокрема, збільшення частки деструктивно-змінених клітин. Це супроводжувалося вираженим когнітивним дефіцитом, що характеризувалося стійкою антероградною амнезією, а саме, зниженням в посттравматичному періоді просторової пам'яті і здатності до навчання. Ліпосомальна трансфекція клітин головного мозку плазмідним вектором, що несе ген ізоформи ε3 апоЕ людини, сприяла зменшенню глибини та поширенню вторинного пошкодження нейронів гіпокампа, збереженню його цитоархітекtonіки, більш швидкому регресові посттравматичного когнітивного дефіциту, відновленню порушених функцій.

Висновок. Генна терапія має терапевтичний потенціал за тяжкої ЧМТ.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, гіпокамп, ультраструктура, когнітивні розлади, генна терапія, аполіпропротеїн Е, експеримент.

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) є актуальною проблемою сучасної медицини. В період 1999–2008 рр. в Україні ЧМТ щороку виникала майже у 100 тис. потерпілих. Частота внутрішньочерепної травми у 2008 р. становила 19,6 на 10 тис. населення [1].

ЧМТ може спричинити різні розлади психічної сфери, що значною мірою погіршують якість життя потерпілих. Навіть легка ЧМТ зумовлює: 1) когнітивні порушення; 2) афективні розлади, до яких належать депресія, тривожність, психоз; 3) порушення поведінки, зокрема, зміни особистості. Когнітивні функції, в тому числі, пам'ять, здатність до навчання, пов'язують з таким надзвичайно чутливим до травматичного впливу відділом мозку, як гіпокамп. Нейрокогнітивні розлади характерні для ЧМТ, їх спостерігають у гострому періоді травми у 40–50% потерпілих. У багатьох з них когнітивні порушення зберігаються протягом тривалого часу або постійно [2, 3]. Отже, лікувальні зусилля мають сприяти мінімізації пошкодження та дисфункції гіпокампа [4].

Метою роботи було дослідження морфологічних змін нейронів гіпокампа та його функціональної характеристики за тяжкої ЧМТ в експерименті, а також терапевтичної ефективності генної терапії, спрямованої на індукцію синтезу в нервовій тканині ізоформи ε3 аполіпропротеїну Е (АпоЕ3 означає білок, апоЕ3-ген).

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведено на дорослих (6–8 міс) щурах-самцях лінії

Wistar (масою тіла 350–400 г), які розподілені на 3 групи по 5 тварин.

– *Контроль* — група інтактних тварин.

– *ЧМТ* — група тварин з тяжкою дифузною ЧМТ.

– *ЧМТ+Пл* — у тварин моделювали ЧМТ у такий самий спосіб, як і в групі *ЧМТ*, і встановлювали в лівий бічний шлуночок мозку канюлю, яку з'єднували з встановленим під шкіру резервуаром (осмотичною помпою ALZET), для внутрішньошлуночкової інфузії протягом 1 доби катіонних ліпосом з плазмідним вектором, який ніс ген апоЕ3.

Тяжку ЧМТ моделювали шляхом вільного падіння вантажу масою 450 г з висоти 1,5 м. Моделювання експериментальної ЧМТ і всі подальші маніпуляції, пов'язані з встановленням канюлі та введенням відповідних розчинів, здійснювали під загальним знеболюванням кетаміном (з розрахунку 0,7 мг/кг маси тіла, внутрішньом'язово). Як лікувальний засіб використовували комплекс катіонних ліпосом DOTAP Methosulfate (Sigma, США) і 25 мкг плазмідного вектора рCMV·SPORT6 (Invitrogen, США), що містив ген апоЕ3 людини, під контролем цитомегаловірусного промотору.

На 10-ту добу тварин виводили з експерименту шляхом внутрішньочеревної ін'єкції розчину тіопентал-натрію (200 мг/кг). Головний мозок вилучали з порожнини черепа. Для підтвердження ефективності трансфекції відділяли мозочок і частину довгастого

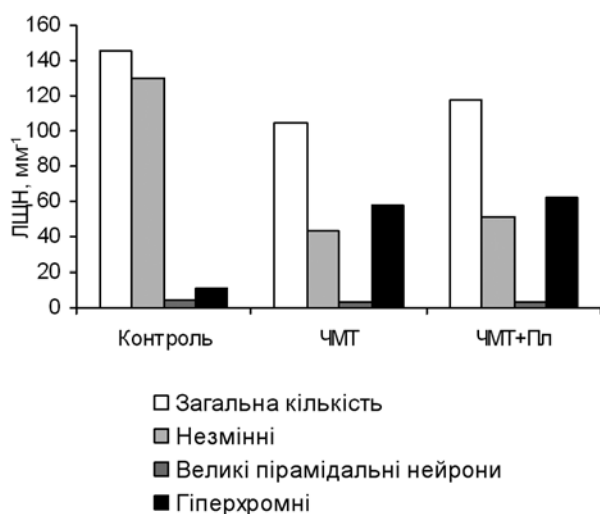


Рис. 1. ЛПЦН СА1 зони гіпокампа щурів з огляду на їх якісну характеристику.

мозку, які вміщували у рідкий азот для подальшого RT-PCR-дослідження.

Електронно-мікроскопічне дослідження. Тонкі фронтальні зрізи (0,5 мм) з ділянки гіпокампа фіксували у 2,5% розчині глутаральдегіду протягом 6 год при температурі 4°C. 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% ураніацетату) та ацетоні, а також заливання в смолу (епон-аралдит) здійснювали за загальноприйнятою методикою. Виготовляли фронтальні напівтонкі зрізи (1 мкм) ділянки гіпокампа, які фарбували толудіновим синім. Ультратонкі зрізи (60–70 нм) контрастували у 2% розчині ураніацетату й цитрату свинцю, досліджували під електронним мікроскопом ПЕМ-125К («Selmi», Україна) за прискорувальної напруги 60 кВ.

Гістологічне та морфометричне дослідження. На напівтонких зрізах з використанням світлооптичного мікроскопа Axiolab (Carl Zeiss, Німеччина) аналізували цитоархітектоніку гіпокампа, обчислювали лінійну щільність нейронів (ЛПЦН), тобто, кількість клітин на одиницю довжини зони СА1 гіпокампа (у 100 полях зору, об'єктив $\times 20$, окуляр $\times 10$).

Нейрофізіологічне дослідження. Порушення когнітивних функцій при експериментальній ЧМТ виявляли шляхом оцінки просторової пам'яті у водному лабіринті Моріса з 7-ї до 10-ї доби після травми. Разом виконували 16 «тренувань» щурів (по 4 «тренування» на день), під час яких тварини навчалися знаходити платформу, приховану під поверхню забарвленої води, покладаючись на зовнішні візуальні орієнтири. У кожний день дослідження для кожного щура визначали «час пошуку», середній для 4 «тренувань» (у секундах), витрачений твариною на досягнення платформи. На підставі цих даних визначали середній «час пошуку» у кожній групі експерименту в конкретний день дослідження. Збільшення «часу пошуку» свідчило про більший дефіцит просторової пам'яті і здатності до навчання.

Статистичну обробку даних проводили з використанням непараметричного методу Вілкоксона–Манна–Уїтні (P_v).

Результати та їх обговорення. Ефективність трансфекції (наявність апоЕ3-мРНК) підтверджена у зразках мозку всіх тварин, яким вводили плазмідний вектор, шляхом візуалізації продуктів ампліфікації (відповідно 295 і 180 п.н. для першої та другої пар використаних праймерів) у методі RT-PCR.

За даними гістологічного дослідження, тяжка дифузна ЧМТ у щурів, відтворена за допомогою «моделі ударного прискорення», на 10-ту добу характеризувалася порушенням цитоархітектоніки гіпокампа, особливо вразливого при ЧМТ, що є морфологічним субстратом когнітивних розладів за травматичного ураження головного мозку. У СА1 зоні гіпокампа відзначені ділянки «випадіння» нейронів, тобто, спостерігали депопуляцію нейронів гіпокампа. При визначенні ЛПЦН встановлене значне зменшення показника — у 1,4 разу (**рис. 1**). Виділяли кілька типів нейронів зони СА1 — незмінні, великі (гіпертрофовані) і гіперхромні. Кількість великих нейронів була стабільною, незалежно від експериментальної групи. Гіперхромні нейрони часто локалізувалися не тільки серед незмінених, а й окремими групами значної довжини. Найбільш показовою була зміна ЛПЦН гіперхромного типу. Припускаємо, що основну частку цих нейронів становлять змінні внаслідок ішемії клітини. Показано, що ЧМТ впливає на зміну розподілу клітин виділених нами типів — збільшується кількість гіперхромних і зменшується — незмінених нейронів.

Результати електронномікроскопічного дослідження також свідчать, що при ЧМТ відбуваються значні деструктивні зміни в зоні СА1 гіпокампа. Виділені на світлооптичному рівні незмінні й гіперхромні нейрони (**рис. 2**) виявилися гетерогенними за своїм складом. Серед гіперхромних (електроннощільних) нейронів відзначали як апоптогічно-змінні клітини, що гинуть (див. **рис. 2**, верхній лівий кут), так і активовані (див. **рис. 2**, праворуч, посередині). Нерідко в ядрах нейронів містилися фібрилярні включення (**рис. 3**, ліве фото), що може свідчити про глибоку перебудову білків ядра і початок необоротних деструктивних процесів у ядрі.

У цитоплазмі нейронів спостерігали вакуолізацію цистерн апарата Гольджі, серйозних змін зазнавали мітохондрії. Під час аналізу ушкодження мітохондрій встановлено, що після травми переважна частина деструктивно-змінених органел значно набрякли (вакуолізовані, з деструкцією і дискмплексацією крист — див. **рис. 3**) або у початкових стадіях деструкції. Виявляли велику кількість гіпертрофованих міто-

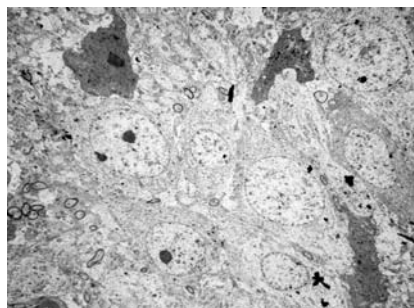


Рис. 2. Електроннограма. Ділянка СА1 зони гіпокампа дорослого щура після ЧМТ. Гетерогенність морфологічних змін, 3 з 10 нейронів — електроннощільні, деструктивно-змінні. 36.×1600.

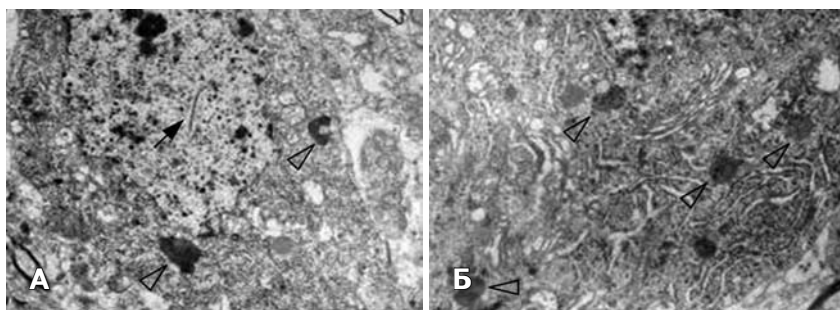


Рис. 3. Електроннограма. Деструктивні зміни в нейронах СА1-зони гіпокампа. А — нейрон пірамідального шару з включенням (позначене стрілкою) у каріоплазмі та великою кількістю набряклих мітохондрій у цитоплазмі. Зб.х6400; Б — ділянка цитоплазми нейрона пірамідального шару, що містить кілька гранул ліпофусцину (позначені трикутниками), поряд з вакуолізованими мітохондріями та дещо набряклими каналцями ендоплазматичної мережі та комплексу Гольджі. Зб.х9600.

хондрій, в деяких з них локальні або тотальні деструктивні зміни. Деякі мітохондрії з ушкодженими мембранами, залишки їх включені у залишкові тільця та гранули ліпофусцину, кількість яких значно збільшувалась — від 1–4 гранул — у контролі до 10 і більше — при ЧМТ. Збільшувалися і розміри окремих гранул. Значна кількість зруйнованих мітохондрій свідчила не тільки про порушення енергозабезпечення клітин, а й про активацію процесів їх загибелі.

За даними морфометричних досліджень, опублікованих нами раніше [5], кількість деструктивно-змінених мітохондрій при ЧМТ збільшується у десятки разів у порівнянні з такою у контролі. У групі ЧМТ спостерігали зменшення кількості активованих мітохондрій — незмінених і помірно набряклих і збільшення кількості різко набряклих, у початкових стадіях деструкції мембран і вакуолізованих форм.

При застосуванні генної терапії (група ЧМТ+Пл) відзначені менша інтенсивність та поширення спричинених ЧМТ деструктивно-дистрофічних змін у нейронах. Індукція синтезу АпоЕ3 справляла позитивний вплив на ЦНС і запобігала утворенню зон вторинної дезінтеграції у травмованому мозку. У цитоплазмі нейронів кількість деструктивно-змінених мітохондрій менша, ніж у тварин з ЧМТ, яким проводили терапію, відповідно 55 і 70%. Як свідчили результати якісного аналізу структурних змін мітохондрій [5], під впливом генної терапії не лише зменшується тяжкість деструкції, а й змінюється співвідношення органел, що перебувають у різному функціональному стані, тобто, в групі ЧМТ+Пл спостерігали деяке збільшення кількості незмінних та функціонально активних (помірно набряклих) органел і зменшення кількості деструктивно-змінених форм — різко набряклих, у початкових стадіях деструкції мембран і вакуолізованих.

Як встановлено нами раніше [6], при ЧМТ глибокі ультраструктурні зміни відбувалися не лише в перикаріонах, а й у відростках нервових клітин. Відзначене пошкодження більш ніж 33% мієлінових волокон. Характерною реакцією є пошкодження аксонів у вигляді їх локального набряку, деформації осевого циліндра, його облітерації, а в деяких спостереженнях — відшарування від мієлінової оболонки. При цьому досить часто спостерігали виражені порушення самих мієлінових оболонок у вигляді розшарування, дезагрегації, порушення ламелярної структури, формування здуттів і випинань. Це супроводжувалося дезінтеграцією,

гомогенізацією і деструкцією внутрішньоклітинних структур нейритів. Спостерігали виражене ушкодження нейрофіламентів, локальну, рідше повну втрату мікротрубочок, що спричиняло порушення аксонального транспорту. Зміни мітохондрій аксонів були аналогічні таким у тілах нейронів. Крім того, відзначали деструктивні зміни деяких синапсів.

При застосуванні плазмідного вектору, що містить ген апоЕ3 (група ЧМТ+Пл), відзначені менша інтенсивність та поширення деструктивно-дистрофічних змін, спричинене ЧМТ. ЛПЩ знижувалася менше (в 1,2 разу), ніж у не-

лікованих тварин, дещо поліпшувався якісний склад популяції нейронів — меншою мірою збільшувалася кількість вакуолізованих і гіперхромних нейронів (див. **рис. 1**). Виявлене нами зменшення кількості нейронів при ЧМТ тісно пов'язане з процесами апоптозу, які, ймовірно, за даними літератури [4], відбуваються в перші дні після травми. Структура аксонів у групі ЧМТ+Пл була пошкоджена меншою мірою, ніж у тварин групи ЧМТ. Нормалізувалися структура осевого циліндра, його цитоскелет (мікротрубочки, нейрофіламенти), мітохондрії, структура мієлінових оболонок. Рідше виявляли набряк і деформацію аксонів. Пошкоджені мієлінові волокна спостерігали з частотою 22%, у групі ЧМТ — 35% [6].

Оцінка впливу генної терапії на динаміку розладів просторової пам'яті у щурів з ЧМТ (**рис. 4**) свідчила, що в групі *Контроль* «час пошуку» платформи у посттравматичному періоді швидко зменшувалася. Вже у перший день дослідження у водному лабіринті Моріса (7-ма доба після травми) відзначали достовірні розбіжності «часу пошуку» платформи: в групі ЧМТ — (86,4±5,41) с, в групі *Контроль* — (69,2±3,56) с (P=0,009). Така різниця зумовлена тим, що в групі *Контроль* щури швидше знаходили платформу вже під час 3-го і 4-го «тренування» у перший день дослідження. У групі ЧМТ «час пошуку» зменшувалася більш повільними темпами, і в усі строки спостереження достовірно перевищував аналогічний показник у групі *Контроль* — (74,2±4,32) та (17,2±3,27) с — на 8-му добу (P=0,009); (64,2±4,21) та (16,2±2,49) с — на 9-ту добу (P=0,009); (61,2±4,32) та (9,6±2,41) с — на 10-ту добу після травми (P=0,009). У групі ЧМТ+Пл трансфер гену АпоЕ3 сприяв більш швидкому регресові когнітивних порушень, зокрема, зменшенню дефіциту просторової пам'яті і здатності до навчання. На 8-му добу експерименту «час пошуку» в дослідній групі становив (49,0±6,21) с, в групі ЧМТ — (74,2±4,32) с (P=0,009); на 9-ту добу — відповідно (34,8±3,96) с та (64,2±4,21) с (P=0,009); на 10-ту добу — (30,2±3,96) та (61,2±4,32) с (P=0,009).

Під час розробки методів експериментальної нейротравматології накопичені дані, які свідчать, що деякі відділи мозку «вибірково вразливі» при травматичному ушкодженні. Встановлено, що не лише за дифузного, а й за суворо локального пошкодження кори великого мозку через деякий час після ЧМТ

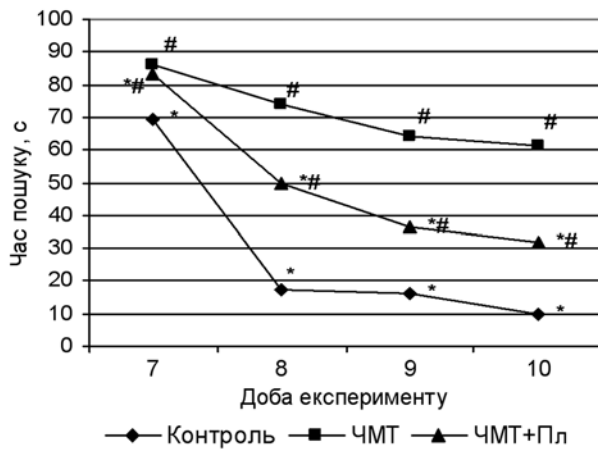


Рис. 4. Вплив ліпосомальної трансфекції плазмідним вектором, що несе ген АпоЕ3, на динаміку когнітивного дефіциту у щурів з експериментальною ЧМТ (різниця показників достовірна у порівнянні з такою: * — в групі ЧМТ, # — в групі Контроль).

спостерігали загибель нейронів на значній відстані від місця первинної травми.

Зручним об'єктом дослідження вибірково вразливих при ЧМТ відділів мозку є гіпокамп, депопуляція нейронів якого є чітким критерієм тяжкості травми як в експериментальних тварин, так і в людини [7, 8]. Незважаючи на те, що механічний вплив на гіпокамп значно менший, ніж на кору великого мозку, гіпокамп зазнає суттєвого пошкодження, в тому числі загибелі клітин [4], тривалого електрофізіологічного порушення [9], виявляли ознаки реактивного гліозу [10]. У свою чергу, застосування методів лікування, що сприяють зменшенню загибелі нейронів гіпокампа, поліпшують функціональні наслідки травми як в експерименті, так і в клініці [11].

Роль гіпокампа в засвоєнні інформації та пам'яті доведена. При пошкодженні цієї структури виявляють неспроможність формувати короткотермінову пам'ять та втрату здатності до навчання, орієнтації в просторі. За даними експериментальних досліджень, при пошкодженнях гіпокампа виявлений функціональний дефіцит, що нагадує такий у потерпілих з ЧМТ. Гіпокамп є також місцем регуляції негативного оберненого зв'язку осі гіпоталамус – гіпофіз – надниркові залози та контролю циркуляції глюкокортикоїдів. Отже, наслідками пошкодження гіпокампа є не тільки порушення пам'яті. Вважають, що при зменшенні об'єму гіпокампа підвищується ризик виникнення депресії, посттравматичних стресових розладів і шизофренії [12]. Отже, запорукою успішного лікування ЧМТ є можливість зменшити вираженість структурного пошкодження гіпокампа і відповідних порушень його функцій [4].

Оскільки в усіх моделях ЧМТ первинне пошкодження кори великого мозку в місці травматичного впливу спричиняє не менш суттєве, а у функціональному плані — більш значуще ураження гіпокампа, вчені стверджують, що питання: «Чому нейрони гіпокампа такі вразливі?» є однією з фундаментальних загадок сучасної нейротравматології [12].

Відповіддю на це запитання може бути різна чутливість до механічної деформації або особливості біохімічної відповіді на пошкодження, притаманної різним відділам головного мозку [13]. Щодо чутли-

вості до механічної деформації, значення можуть мати розміри клітин, щільність, ступінь зв'язності та структура цитоскелету. Зокрема, показано, що великі та не щільно «упаковані» клітини гіпокампа більш схильні до ураження механічною ударною хвилею [14]. При вивченні чутливості нейронів кори великого мозку і гіпокампа до механічного розтягування *in vitro* доведено, що, незважаючи на більш тривале збільшення проникності мембран у нейронах кори, у нейронах гіпокампа значно більша концентрація внутрішньоклітинного Ca^{2+} та більш часта загибель клітин [13]. У цьому ж дослідженні виявлені регіональні особливості біохімічних змін у пошкоджених нейронах. Зокрема, в нейронах гіпокампа після ЧМТ спостерігали відстрочений та тривалий дефіцит АТФ, що може пояснювати більшу частоту загибелі клітин, тоді як у нейронах кори він виникає у ранні строки і менш тривалий. З одного боку, дефіцит АТФ може бути зумовлений більшим навантаженням нейронів гіпокампа кальцієм, з іншого — гіперактивацією Na^+/K^+ -АТФази, оскільки доведено, що селективна деполяризація в гіпокампі після ЧМТ залежить від дисфункції Na^+/K^+ -АТФази і долається підвищенням активності АТФ.

Ще однією причиною вразливості гіпокампа при ЧМТ можуть бути особливості його будови. Він складається з шести регіонів, що мають цілком різну цитоархітектоніку і пов'язані унікальними непрямыми проєкційними шляхами [15]. Життєво важливі синаптичні зв'язки між відділами гіпокампа можуть бути його «Ахілесовою п'ятою», оскільки пошкодження одного відділу здатне спричинити ураження інших через нестачу трофічних чинників або гіперактивність збудливих глутаматергічних проєкцій [12].

Також суттєвою є різниця вразливості різних популяцій клітин у межах гіпокампа. СА1 відділ надзвичайно чутливий до індукованої глутаматом ексайтотоксичності та глобальної ішемії, ділянки СА3 відділу та гілуса (hilus) вважають чутливими до травматичного впливу [16, 17].

Неврологічні наслідки ЧМТ залежать не тільки від поширення первинного пошкодження головного мозку, а й вторинних нейрохімічних і патофізіологічних змін, що відбуваються внаслідок механічної травми і спричиняють подальше ураження головного мозку й формування функціонального дефіциту. В основі вторинного пошкодження мозку лежать декілька механізмів загибелі нервових клітин, зокрема, некроз, апоптоз або поєднання цих механізмів [4, 18, 19]. Проте, їх непросте взаємодія значно ускладнює визначення, який саме з шляхів загибелі клітин має стати першочерговою мішенню терапії при ЧМТ. Припускають, що розпізнавання шляхів смерті клітин сприятиме розробці нових методів лікування, здатних впливати на різні компоненти каскаду вторинного пошкодження головного мозку [20, 21].

У нашому дослідженні частота загибелі нейронів гіпокампа зменшувалась внаслідок застосування генної терапії, спрямованої на індукцію синтезу у нервовій тканині ізоформи $\epsilon 3$ АпоЕ. Після ЧМТ АпоЕ3 сприяє репарації ліпідного компоненту мембран нейронів і гліцитів, забезпечуючи транспорт холестерину й фосфоліпідів під час реіннервації [22], модифікує запальну реакцію активованої мікроглії в головному мозку, захищає нервові клітини від ексайтотоксичного ураження

[23]. Можливими механізмами, за допомогою яких АпоЕ3 обмежує структурні прояви і функціональні наслідки ЧМТ, є вплив на нейрогенез, запальну відповідь, процесинг А β , метаболізм нейронів [24]. Дослідження останніх років свідчать про антиапоптозні властивості АпоЕ3 [25]. Зважаючи на зазначене, закономірною є гіпотеза про доцільність використання АпоЕ3 як терапевтичного агента, здатного справляти лікувальний вплив. Актуальним є пошук методів доставки АпоЕ3 до вогнищ ураження [26]. За нашими даними, одним з таких методів може бути генна терапія.

Висновки. 1. Характерними ознаками тяжкої ЧМТ у щурів є депопуляція нейронів гіпокампа, порушення його цитоархітекtonіки, а також значні зміни якісних характеристик нейронів, зокрема, збільшення кількості деструктивно-змінених клітин. Це супроводжується вираженим когнітивним дефіцитом, що характеризується стійкою антероградною амнезією, а саме, зниженням в посттравматичному періоді просторової пам'яті та здатності до навчання.

2. Застосування ліпосомальної трансфекції клітин головного мозку плазмідним вектором, що несе ген ізоформи $\epsilon 3$ апоЕ людини, сприяє зменшенню глибини та поширення вторинного пошкодження нейронів гіпокампа, збереженню його цитоархітекtonіки, більш швидкому регресові посттравматичного когнітивного дефіциту й відновленню порушених функцій.

Список літератури

1. Лехан В.М. Особливості епідеміології черепно-мозкової травми в Україні / В.М. Лехан, А.П. Гук // Україна. Здоров'я нації. — 2010. — №2. — С.7–14.
2. Magnesium attenuates post-traumatic depression/anxiety following diffuse traumatic brain injury in rats / L. Fromm, V. Pharm, D.L. Heath [et al.] // J. Am. Coll. Nutr. — 2004. — V.23, N5. — P.529–533.
3. Greve K.W. The Booklet Category Test and malingering in traumatic brain injury: classification accuracy in known groups / K.W. Greve, K.J. Bianchini, T. Roberson // Clin. Neuropsychol. — 2007. — V.21. — P.318–237.
4. Effect of post-traumatic mild hypothermia on hippocampal cell death after traumatic brain injury in rats / F. Jia, Q. Mao, Y.M. Liang [et al.] // J. Neurotrauma. — 2009. — V.26. — P.243–252.
5. Білошицький В.В. Структурні зміни мітохондрій клітин гіпокампа при експериментальній черепно-мозковій травмі та генній терапії з використанням гену апоЕ3 / В.В. Білошицький, С.А. Михальський, Т.Ю. Квітницька-Рижова // Вісн. морфології. — 2011. — Т.17, №2. — С.238–244.
6. Білошицький В.В. Вплив ліпосомальної трансфекції клітин головного мозку геном апоЕ3 на пошкодження аксонів, зумовлене експериментальною черепно-мозковою травмою / В.В. Білошицький, С.А. Михальський, Т.Ю. Квітницька-Рижова // Укр. нейрохірург. журн. — 2011. — №3. — С.43–49.
7. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat / D.H. Smith, X.H. Chen, J.E.S. Pierce [et al.] // J. Neurotrauma. — 1997. — V.14. — P.715–727.
8. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects / D.H. Smith, H.D. Soares, J.S. Pierce [et al.] // J. Neurotrauma. — 1995. — V.12. — P.169–178.
9. Traumatic brain injury impairs synaptic plasticity in hippocampus in rats / B. Zhang, X. Chen, T. Tan [et al.] // Chin. Med. J. — 2011. — V.124, N5. — P.740–745.
10. Sofroniew M.V. Reactive astrocytes in neural repair and protection / M.V. Sofroniew // Neuroscientist. — 2005. — V.11. — P.400–407.
11. Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on hippocampal neurons after TBI / B.-T. Kim, V.L.R. Rao, K.A. Sailor [et al.] // J. Neurosurg. — 2001. — V.95, N4. — P.674–679.
12. McCarthy M.M. Stretching the truth. Why hippocampal neurons are so vulnerable following traumatic brain injury / M.M. McCarthy // Exp. Neurol. — 2003. — V.184. — P.40–43.
13. Geddes D.M. Susceptibility of hippocampal neurons to mechanically induced injury / D.M. Geddes, M.C. LaPlaca, R.S. Cargill // Exp. Neurol. — 2003. — V.184. — P.420–427.
14. Instantaneous perturbation of dentate interneuronal networks by a pressure wave-transient delivered to the neocortex / Z. Toth, G.S. Hollrigel, T. Gorcs, I. Soltesz // J. Neurosci. — 1997. — V.17. — P.8106–8117.
15. Harry G.J. Dentate gyres: alteration that occur with hippocampal injury / G.J. Harry, C.L. d'Hellencourt // NeuroToxicology. — 2003. — V.24. — P.343–356.
16. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link of between head trauma and disorders of the hippocampus / D.H. Lowenstein, M.J. Thomas, D.H. Smith, T.K. McIntosh // J. Neurosci. — 1992. — V.12. — P.4846–4853.
17. Nawashiro H. Selective vulnerability of hippocampal CA3 neurons to hypoxia after mild concussion in the rat / H. Nawashiro, K. Shima, H. Chigaskai // Neurol. Res. — 1995. — V.17. — P.258–269.
18. From cell death to neuronal regeneration: building a new brain after traumatic brain injury / N.C. Royo, J.W. Schouten, C.T. Fulp [et al.] // J. Neuropathol. Exp. Neurol. — 2003. — V.62, N8. — P.801–811.
19. Stoica B.A. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury / B.A. Stoica, A.I. Faden // Neurotherapeutics. — 2010. — V.7, N1. — P.3–12.
20. Faden A.I. Neuroprotection and traumatic brain injury: theoretical option or realistic proposition / A.I. Faden // Curr. Opin. Neurol. — 2002. — V.15. — P.707–712.
21. Faden A.I. Neuroprotection and traumatic brain injury: the search continues / A.I. Faden // Arch. Neurol. — 2001. — V.58. — P.1553–1555.
22. Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease / J. Poirier // Trends Neurosci. — 1994. — V.17, N12. — P.525–530.
23. Laskowitz D.T. Apolipoprotein E and neurological disease: Therapeutic potential and pharmacogenomic interaction / D.T. Laskowitz, M.P. Vitek // Pharmacogenomics. — 2007. — V.8, N8. — P.959–969.
24. 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.
25. 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.
26. Teasdale G.M. Craniocerebral trauma: protection and retrieval of the neuronal population after injury / G.M. Teasdale, D.I. Graham // Neurosurgery. — 1998. — V.43, N4. — P.723–738.

Надійшла до редакції 24.03.12

Прийнята до публікації 17.05.12

Адреса для листування:

Білошицький Вадим Васильович
04050, Київ, вул. Платона Майбороди, 32
Інститут нейрохірургії
ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України,
відділ травми центральної нервової системи
e-mail: headinjury@ukr.net

Белошицкий В.В.¹, Михальский С.А.², Гридина Н.Я.³, Квитницькая-Рыжова Т.Ю.², Педаченко Е.Г.¹

¹ Отдел травмы центральной нервной системы, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, г. Киев, Украина

² Лаборатория морфологии и цитологии, Институт геронтологии им. акад. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины, г. Киев, Украина

³ Лаборатория экспериментальной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, г. Киев, Украина

Структурно-функциональная характеристика повреждения нейронов гиппокампа при экспериментальной черепно-мозговой травме и генной терапии с использованием гена апоЕ3

Вступление. Изучены морфологические изменения нейронов гиппокампа и его функциональная характеристика при тяжелой черепно-мозговой травме (ЧМТ) в эксперименте, а также терапевтическая эффективность генной терапии, направленной на индукцию синтеза в нервной ткани изоформы ε3 аполипопротеина E.

Материалы и методы. Тяжелую ЧМТ моделировали у крыс под общим обезболиванием путем свободного падения груза массой 450 г с высоты 1,5 м. Внутривенную инфузию катионных липосом DOTAP, несущих 25 мкг плазмидного вектора рCMV·SPORT6 с кДНК гена апоЕ3, осуществляли с помощью осмотических помп ALZET.

Результаты. Характерными признаками тяжелой ЧМТ в эксперименте были депопуляция нейронов гиппокампа, нарушения его цитоархитектоники, в частности, увеличение количества деструктивно-измененных клеток. Это сопровождалось выраженным когнитивным дефицитом, что характеризовалось стойкой антероградной амнезией, а именно снижением в посттравматическом периоде пространственной памяти и обучаемости. Липосомальная трансфекция клеток головного мозга плазмидным вектором, несущим ген изоформы ε3 апоЕ человека, способствовала уменьшению глубины и распространности повреждения нейронов гиппокампа, сохранению его цитоархитектоники, более быстрому регрессу посттравматического когнитивного дефицита, восстановлению нарушенных функций.

Вывод. Генная терапия обладает терапевтическим потенциалом при лечении тяжелой ЧМТ.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, гиппокамп, ультраструктура, когнитивные расстройства, генная терапия, аполипопротеин E, эксперимент.

Поступила в редакцию 24.03.12
Принята к публикации 17.05.12

Адрес для переписки:

Белошицкий Вадим Васильевич
04050, Киев, ул. Платона Майбороды, 32
Институт нейрохирургии
им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины,
отдел травмы центральной нервной системы
e-mail: headinjury@ukr.net

Biloshytsky V.V.¹, Mikhalsky S.A.², Gridina N.Ya.³, Kvitnytska-Ryzhova T.Yu.², Pedachenko E.G.¹

¹ Neurotrauma Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

² Laboratory of Morphology and Cytology, Institute of Gerontology named after D.F. Chebotaryov NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

³ Laboratory of Experimental Neurosurgery, Institute of Neurosurgery named after A.P. Romodanov NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

Structural and functional characteristic of hippocampal neuronal damage after experimental traumatic brain injury and apoE3 gene therapy

Introduction. The purpose of the study was to estimate the neuronal morphologic changes in hippocampus and its functional characteristics after experimental severe traumatic brain injury (TBI), and the possibilities of such disorders correction by means of gene therapy that launches the synthesis of ε3 isoform of apolipoprotein E in brain tissue.

Materials and methods. Severe diffuse TBI in rats was modeled 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·SPORT6 with cDNA of apoE3 gene was infused intraventricularly using ALZET osmotic pumps.

Results. Severe TBI is characterized by the neuronal depopulation of hippocampus, damage to its cytoarchitectonics with considerable changes of neuronal qualitative characteristics including the increased proportion of destructively changed cells. It is accompanied by profound cognitive deficits, particularly persistent anterograde amnesia which is characterized by posttraumatic decrease of spatial memory and learning. The liposome-mediated brain tissue transfection with plasmid vector carrying the gene of ε3 isoform of apolipoprotein E diminishes the depth and extent of secondary injury of hippocampal neurons, preserves hippocampal cytoarchitectonics and facilitates the speedy recovery of posttraumatic cognitive deficits.

Conclusion. Gene therapy has therapeutic potential in treatment of severe TBI.

Key words: traumatic brain injury, hippocampus, ultrastructure, cognitive disorders, gene therapy, apolipoprotein E, experiment.

Received March 24, 2012

Accepted May 17, 2012

Address for correspondence:

Vadym Biloshytsky
04050, 32 Platon Mayboroda St, Kiev, Ukraine
Institute of Neurosurgery
named after acad. A.P. Romodanov NAMS Ukraine,
Neurotrauma Department
e-mail: headinjury@ukr.net

Коментар

до статті Білошицького В.В. та співавторів «Структурно-функціональна характеристика пошкодження нейронів гіпокампа при експериментальній черепно-мозковій травмі і генній терапії з використанням гену апоЕ3»

Представлена стаття є фрагментом тривалого експериментального дослідження, результати якого автори продовжують публікувати у серії робіт. Актуальність теми не викликає сумнівів, оскільки черепно-мозкова травма (ЧМТ) створює для суспільства серйозний тягар медико-соціальних та економічних проблем. Авторі зосереджують увагу на змінах такого чутливого до травми відділу головного мозку, як гіпокамп, і зумовленому цими змінами посттравматичному функціональному дефіциті. З метою корекції порушень автори пропонують застосування аполіпропротеїну Е, синтез якого в клітинах травмованого головного мозку збільшується під впливом генної терапії. Одержані результати заслуговують на увагу, оскільки перебувають у руслі сучасного пошуку ефективних методів лікування, спрямованих на зменшення вираженості наслідків ЧМТ в клінічних умовах. Позитивною рисою є детальне патогенетичне пояснення змін, які відбуваються внаслідок травми, а також обґрунтування лікувального ефекту аполіпропротеїну Е. В роботі наведені цікаві дані літератури щодо сучасного уявлення про патогенез ЧМТ. Так, обговорюючи результати власних досліджень та співставляючи їх з новими даними літератури, автори звертають увагу на деякі принципові положення сучасної нейротравматології.

1. У головному мозку, незалежно від тяжкості травми, є «вибірково вразливі» відділи, які можуть локалізуватися на віддаленні від зони травми.

2. Через 10 діб після ЧМТ в головному мозку зменшується кількість нейронів як у вогнищі забою, так і в інших ділянках, що можна пов'язати та пояснити лише формуванням вторинних післятравматичних порушень як в ЦНС, так і в організмі в цілому.

3. За даними електронномікроскопічних досліджень на 10-ту добу після ЧМТ виявляють пошкодження не лише нейроцитів, а й їх відростків і особливо мієлінових оболонок, а отже, і олігодендроцитів, а також синапсів. Тобто, патологічний процес поширюється

не тільки на нейрони, які тісно залежать від гіпоксії та функції тканинного дихання, а й на інші клітини та структури, зокрема, мієлінові оболонки.

4. Звернута увага на роль гіпокампа у патогенезі ЧМТ та її наслідків. Сьогодні немає пояснень, чому така структура, як гіпокамп, розташована на великій відстані від зони травми, зазнає значних змін після травми, та чому не весь гіпокамп, а лише одна його ділянка. Авторі припускають, що провідну роль у пошкодженні гіпокампа відіграє механічний чинник, проте, тоді чому не всього, а лише однієї зони. Можливо, тут є й інші пояснення, які треба досліджувати.

Наведені нові дані про ЧМТ доповнюють наше уявлення про її патогенез, важливість вивчення не лише зони забою, а й інших ділянок головного мозку. Отримані дані стосуються періоду до 10-ї доби після травми та поширення пошкодження практично на весь головний мозок, вони дозволяють ще раз говорити про ПОСТТРАВМАТИЧНУ ХВОРОБУ, яку вивчали у 80-ті роки минулого століття під керівництвом акад. А.П. Ромоданова. Причин таких поширених змін структури тканини мозку може бути багато, починаючи з оксидантного стресу і до апоптозних та імунних чинників. Все це має важливе значення для клінічної практики, а саме, патогенетично-обґрунтованої терапії, яка має бути спрямована не лише на ранній період ЧМТ, а й на вторинні патологічні реакції та профілактику вторинного пошкодження мозку. З цією метою використано генну конструкцію з апоЕ3, яка сприяла корекції порушень після ЧМТ. На жаль, авторі не виділили первинний механізм дії апоЕ3, а лише відзначили його поліфункціональність, це завдання подальших досліджень з використанням інших методів.

Одержані результати і сформульовані авторами положення обґрунтовані посиланнями на сучасні дані літератури, що представляє певний інтерес для нейрохірургів.

*М.І. Лісяний, член-кор. НАМН України, професор,
завідувач відділу нейроімунології
Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України*