

УДК 616.1/9-055.5/7-092]-085:616.89-008.19:591.481.1:616-001-092.9.259

Білошицький В.В., Величко О.М., Гридiна Н.Я., Циба Л.О., Педаченко Є.Г.

Вплив ліпосомальної трансфекції в клітини головного мозку гену апо Е3 на дослідницьку поведінку та емоційний стан щурів після експериментальної черепно-мозкової травми

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) може спричинити численні розлади психічної сфери, що значною мірою погіршують якість життя потерпілих. Навіть за легкої ЧМТ спостерігають подібні розлади, зокрема: 1) когнітивні порушення; 2) афективні розлади, до яких належать депресія, тривожність, психоз; 3) порушення поведінки, зумовлені змінами особистості. За даними літератури, клінічно значущі розлади психіки після ЧМТ виявляють майже у 50% потерпілих, у загальній популяції — у 18% [1, 2].

Незважаючи на значне поширення та важливу роль порушень психіки, зокрема, афективних розладів при ЧМТ, вони практично не вивчені, фундаментальні дослідження, присвячені ЧМТ, концентрувалися переважно на вивченні когнітивного, сенсорного та/або рухового дефіциту після травми. Якщо застосування водного лабіринту Мориса й інших способів оцінки просторової пам'яті широко впроваджене, досліджень поведінки тварин за ЧМТ у новому середовищі, що відображує тяжкість стресу й вираженість тривожності та є еквівалентом афективних розладів у людини, не було [1, 3].

Метою роботи є дослідження порушень дослідницької поведінки й емоційного стану щурів за тяжкої дифузної ЧМТ в експерименті, а також можливостей корекції зазначених змін з використанням методу генної терапії, спрямованої на індукцію синтезу в нервовій тканині ізоформи $\epsilon 3$ аполіпопротеїну Е.

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

– *Контроль* — 5 інтактних тварин.

– *Пл* — 5 тварин, яким встановлювали в лівий бічний шлуночок канюлю, з'єднували її з встановленим під шкіру резервуаром (осмотичною помпою) для внутрішньошлуночкової інфузії катіонних ліпосом з плазмідним вектором, що ніс ген апо Е3.

– *ЧМТ* — 5 тварин, у яких моделювали ЧМТ.

– *ЧМТ+Пл* — 6 тварин з експериментальною ЧМТ, яким встановлювали в лівий бічний шлуночок канюлю, з'єднували її з встановленим під шкіру резервуаром (осмотичною помпою) для внутрішньошлуночкової інфузії катіонних ліпосом з плазмідним вектором, що ніс ген апо Е3, у післятравматичному періоді.

Тяжку ЧМТ моделювали шляхом вільного падіння вантажу вагою 450 г з висоти 1,5 м. ЧМТ і всі хірургічні маніпуляції здійснювали під загальним наркозом шляхом внутрішньом'язового введення розчину каліпсола в дозі 0,7 мг/кг. Як лікувальний препарат застосовували комплекс катіонних ліпосом DOTAP Methosulfate (виробництва Sigma) і 25 мкг плазмідного вектору pCMV-SPORT6 (виробництва Invitrogen), що містив ген апо Е3 під контролем цитомегаловірусного промотора. У тварин оцінювали

вплив генної терапії на дослідницьку поведінку й емоційний стан у тесті “відкрите поле”, ефективність трансфекції методом RT-PCR у зразках тканини мозку, отриманих на 10-ту добу після травми, впливу генної терапії на морфометричні характеристики гіпокампу, якісні та кількісні ультраструктурні зміни гіпокампу за експериментальної ЧМТ. Результати даних RT-PCR, морфометричного та морфологічного дослідження нами опубліковані раніше [4].

Дослідницьку поведінку й емоційний стан щурів досліджували на 7-му добу після травми (операції) та у тварин контрольної групи. Експериментальна установка “відкрите поле” — це квадратна камера розмірами 90×90 см з пластмасовими чорними стінками заввишки 49 см, освітлена єдиним у приміщенні інтенсивним джерелом світла (електричною лампою). Пластикова підлога апарату розкреслена на 36 однакових квадратів розмірами 15×15 см. Квадрати виділяли як периферійні, прилеглі до стінок камери (20) та центральні (16). У квадратах, у шаховому порядку просвердлені 16 отворів діаметром 1 см, що імітували нірки. Тварину поміщали в центр установки і спостерігали за її поведінкою протягом 5 хв. Дослідницьку поведінку оцінювали шляхом обчислення кількості квадратів, які тварина перетинала всіма лапками протягом тесту (досліджували загальну кількість, а також число периферійних і центральних квадратів), вертикальних стійок (число епізодів вставання на задні лапки для дослідження навколишнього середовища у вищій площині) і заглядань у нірки. Для додаткової оцінки емоційного стану тварин включали кількість епізодів грумінгу (активної поведінки тварин, спрямованої на очищення поверхні тіла, тобто, вмивання, вилизування шерсті) і епізодів дефекації (фекальних болюсів) протягом 5 хв. Підлогу установки ретельно витирали спиртом перед вміщенням кожного щура, щоб усунути залишкові нюхові орієнтири. Тестування проводили в звукоізолюваному приміщенні з постійними температурою й освітленням. Тварин доставляли до лабораторного приміщення в “домашній” клітці, їх доглядали ті самі дослідники і персонал віварію до завершення експерименту.

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

Результати та їх обговорення. Щури групи *Контроль* протягом 5 хв відвідували у середньому (65,4±7,33) квадрати “відкритого поля” (*рис. 1*). У тварин групи *ЧМТ* виявлене значне зниження спон-

тальної дослідницької поведінки порівняно з такою у *Контролі* на 7-му добу після перенесеної ЧМТ. Кількість квадратів "відкритого поля", відвіданих тваринами протягом 5 хв, становила $(22,4 \pm 6,07)$, тобто, 34,3% від показника в групі *Контроль* (різниця достовірна, $P=0,009$). Зниження спонтанної дослідницької активності супроводжувалося фризинговою повединою (freezing — замерзання), коли тварина "завмирає" на місці, частіше в кутку "відкритого поля" і припиняє досліджувати навколишнє середовище. Вважають, що така поведінка відображає підвищений рівень стресу й тривожності, проте, не зумовлена недостатністю сенсорної або рухової сфери [5, 6]. Подібних завмирань ми не спостерігали в групі *Контролю*, тварини безперервно досліджували нову обстановку.

Цікавим результатом, одержаним в нашому дослідженні, є достовірне зниження дослідницької поведінки у псевдооперованих щурів групи *Пл*, у яких після операції накладання фрезевого отвору й встановлення внутрішньошлуночкової канюлі на 7-му добу експерименту виявляли достовірне зниження кількості відвіданих квадратів до $50,8 \pm 5,22$ ($P=0,016$). Такі дані відповідають результатам, одержаним нами при морфологічному дослідженні головного мозку цих тварин, і даними інших дослідників про те, що "псевдооперація" (sham surgery) може спричинити травматичні зміни в головному мозку, що супроводжуються неврологічними розладами, зокрема судорогами [1, 7, 8].

Проведення тваринам генної терапії, спрямованої на індукцію синтезу в нервовій тканині ізоформи $\epsilon 3$ апоЕ (група *ЧМТ+Пл*), сприяло відновленню спонтанної дослідницької поведінки, що відображає зниження рівня стресу й тривожності. Кількість відвіданих квадратів "відкритого поля" на 7-му добу після травми становила $49,5 \pm 6,47$, що, на відміну від групи *ЧМТ*, складало 75,7% від показника в групі *Контроль*. І хоча цей показник у лікованих щурів не досягав норми, тобто, значень у групі *Контроль* (зберігалась достовірна різниця, $P=0,011$), він достовірно перевищував такий у групі *ЧМТ* ($P=0,006$).

Подальше вивчення впливу ліпосомальної трансфекції тканини головного мозку плазмідним вектором з геном апо Е3 на вираженість стресу й тривожності у

щурів з ЧМТ стосувалося оцінки їх звикання до нової обстановки, що характеризується активнішим дослідженням центральної частини "відкритого поля". Перебування у периферійних квадратах "відкритого поля" відповідає закономірностям, характерним для загальної кількості відвіданих квадратів. Так, у середньому кількість периферійних квадратів, відвіданих щурами групи *ЧМТ* на 7-му добу після травми, становила $21,0 \pm 6,28$, що складало 35,2% від показника у групі *Контроль* — $59,6 \pm 7,09$ ($P=0,009$). Після "псевдооперації" в групі *Пл* також відзначали достовірне підвищення рівня стресу й тривожності, що характеризувалося зменшенням кількості відвіданих периферійних квадратів до $49,2 \pm 5,02$ ($P=0,022$). Після проведеного в групі *ЧМТ+Пл* лікування кількість відвіданих периферійних квадратів на 7-му добу після травми збільшилась до $46,8 \pm 7,19$ (79,3% від показника в групі *Контроль*), хоча й без достовірної нормалізації ($P=0,018$), проте, з достовірним перевищенням даних в групі *ЧМТ* ($P=0,006$).

Дещо інші зміни відзначені щодо відвідування тваринами центральних квадратів "відкритого поля". У порівнянні з *Контролем* (кількість відвідувань центральних квадратів — $5,8 \pm 2,95$), як після травми (група *ЧМТ*), так і "псевдооперації" (група *Пл*) рівень стресу та тривожності на 7-му добу після травми характеризувався відсутністю звикання до нового середовища — відповідно $(1,8 \pm 0,84)$ відвідування ($P=0,016$) і $(2,4 \pm 1,52)$ відвідування центральних квадратів ($P=0,028$). У той же час, генна терапія з використанням гену апо Е3 сприяла збільшенню кількості відвіданих центральних квадратів до $4,33 \pm 1,21$, що не відрізнялося від показника в групі *Контроль* ($P=0,411$) і достовірно перевищувало дані в групі *ЧМТ* ($P=0,011$).

Дослідження інших аспектів дослідницької поведінки щурів, зокрема вертикальної активності (рис. 2), показало, що кількість вертикальних стійок в групі *ЧМТ* на 7-му добу після травми становила $7,6 \pm 2,88$, у *Контролі* — $19,6 \pm 2,79$ ($P=0,009$). Вертикальна активність тварин була також достовірно знижена в групі *Пл* — $(13,4 \pm 3,43)$ вертикальних стійок протягом 5 хв ($P=0,037$), що свідчило про травматичність операції з встановлення канюлі та її негативний вплив на дослідницьку поведінку й емоційний стан

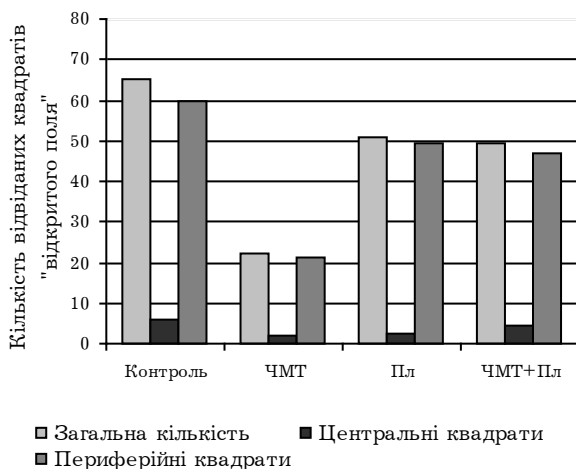


Рис. 1. Вплив ліпосомальної трансфекції головного мозку геном апо Е3 на дослідницьку поведінку щурів після тяжкої дифузної ЧМТ.

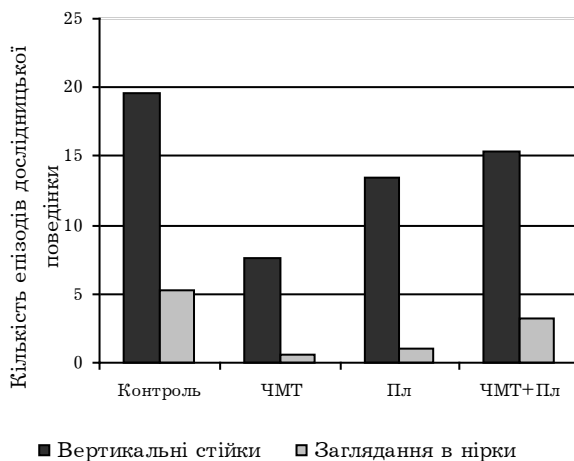


Рис. 2. Вплив ліпосомальної трансфекції головного мозку геном апо Е3 на дослідницьку поведінку щурів після тяжкої дифузної ЧМТ.

експериментальних тварин. Проведене лікування в групі *ЧМТ+Пл* сприяло відновленню вертикальної активності — $(15,3 \pm 3,88)$ стійки (різниця з *Контролем* недостовірна, $P=0,10$) з достовірною відмінністю від показника в групі *ЧМТ* ($P=0,014$).

Подібні зміни виявлені й щодо показника “заглядання в нірки”. Порівняно з *Контролем* — $(5,2 \pm 2,77)$ епізоди протягом 5 хв цей патерн дослідницької поведінки достовірно гальмувався на 7-му добу як після *ЧМТ* — $(0,6 \pm 0,55)$ епізодів ($P=0,009$), так і після встановлення канюлі в групі *Пл* — $(1,0 \pm 1,0)$ епізод ($P=0,016$). Ліпосомальна трансфекція тканини головного мозку щурів з *ЧМТ* плазмідним вектором, що несе ген апо Е3, сприяла відновленню цього показника в групі *ЧМТ+Пл* — $(3,2 \pm 1,17)$ епізодів заглядання в нірки; відмінність від *Контролю* недостовірна ($P=0,235$) з достовірною відмінністю показників у групі *ЧМТ* ($P=0,006$).

У дослідженні не виявлений вплив як *ЧМТ*, так і досліджуваного лікування на такий показник емоційного стану тварини, як “грумінг” (рис. 3). Порівняно з групою *Контроль* — $(3,0 \pm 0,71)$ епізоди грумінгу протягом 5 хв на 7-му добу експерименту, кількість епізодів грумінгу достовірно не різнилась у групах *ЧМТ* — $(4,2 \pm 1,48)$ епізодів ($P=0,144$), *Пл* — $(3,0 \pm 1,0)$ епізодів ($P=1,0$) та *ЧМТ+Пл* — $(3,17 \pm 0,98)$ епізод ($P=0,715$). Так само не виявлено різниці між показниками в групах *ЧМТ* і *ЧМТ+Пл* ($P=0,201$).

Інший показник емоційного стану — кількість фекальних болюсів протягом 5 хв у “відкритому полі” на 7-му добу експерименту достовірно відрізнявся від такого у *Контролі* — $(0,6 \pm 1,34)$ болюсів в групах *ЧМТ* — $(5,0 \pm 2,5)$ болюсів ($P=0,016$) і *Пл* — $(3,4 \pm 2,07)$ болюсів ($P=0,037$), що свідчило про підвищений рівень стресу у тварин цих груп. Після проведеного лікування в групі *ЧМТ+Пл* цей показник суттєво не відрізнявся від такого в інтактних тварин — $(2,33 \pm 1,63)$ болюсів ($P=0,083$), проте, достовірної різниці від показника в групі *ЧМТ* не було ($P=0,10$).

Одержані результати свідчать, що за тяжкої дифузної *ЧМТ* у щурів виникають виражені порушення дослідницької поведінки й емоційного стану, що відображає підвищення рівня стресу й тривожності. Індукція синтезу в нервовій тканині ізоформи $\epsilon 3$ апоЕ методом генної терапії, крім позитивного впливу

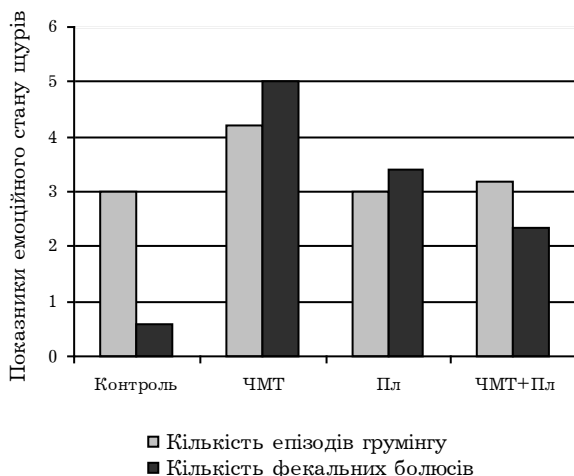


Рис. 3. Вплив ліпосомальної трансфекції головного мозку геном апо Е3 на емоційний стан щурів після тяжкої дифузної *ЧМТ*.

на структурні зміни, характеризується здатністю справляти лікувальний вплив і на її функціональні розлади, у тому числі ті, що стосуються психічної сфери. Це дає змогу вважати генну терапію перспективним методом лікування *ЧМТ*, що дозволить попереджати виникнення спричинених травмою афективних розладів.

Афективні розлади належать до найбільш поширених розладів психіки після *ЧМТ*. Так, депресію виявляють у 6–77% потерпілих, тривожні розлади — в 11–70% з чіткою тенденцією до збільшення частоти цієї патології з часом [9, 10]. Значні розбіжності наведених показників можна пояснити тим, що *ЧМТ* нерідко супроводжується порушенням самосвідомості, що зумовлює зміни сприйняття й самооцінки симптомів афективних розладів. Також прояви афективних порушень, які виникають одразу після травми, можуть маскуватися симптомами самої *ЧМТ*, що ускладнює їх виявлення і зумовлює недооцінку їх справжнього поширення. Крім того, емоційні розлади можуть прогресувати протягом посттравматичного періоду, що значно перешкоджає реабілітації потерпілих і потребує їх тривалого й витратного лікування [11, 12].

В експериментальній нейрофізіології існують численні методи, що дозволяють вивчати депресивно-подібну та тривожно-подібну поведінку тварин. Депресивно-подібну поведінку досліджують з використанням тестів, що виявляють гіперактивність, гіперемоційність та пригнічення соціальної й сексуальної активності. Для тривожно-подібної поведінки характерні пригнічення соціальної взаємодії та неофобія [13]. Вперше в експериментальній нейротравматології цей аспект психіки тварин вивчений дослідниками з Університету Аделаїди (Австралія) у 2003–2004 рр. [11, 14, 15, 16]. Для оцінки вираженості стресу й тривожності, рівня депресивної поведінки при експериментальній *ЧМТ* запропоноване використання тесту “відкритого поля”.

“Відкрите поле” є достатньо вивченою моделлю, розробленою для оцінки рівня стресу й тривожності у щурів на основі змін їх спонтанної дослідницької поведінки [17]. У багатьох дослідженнях підтверджено надійність методу у вивченні особливостей тривожності й депресії у гризунів [18, 19]. В камеру квадратної або круглої форми, дном якої є “відкрите поле” — біла поверхня, розкреслена на однакові квадрати, вміщують тварину і спостерігають її поведінку впродовж 5 хв [3, 11, 14–16]. Під час перебування тварини в новій обстановці (яскраво освітленій камері, більшій за клітку, в якій живе щур) виникає дослідницька поведінка, якій перешкоджають умови, що спричиняють страх. Основним показником, який досліджують шляхом спостереження, є кількість квадратів, відвіданих твариною. Доведено, що зниження спонтанної дослідницької поведінки (зменшення кількості відвіданих квадратів) відображає підвищення рівня стресу й/або тривожності у тварини [5, 6]. Крім загальної кількості досліджених квадратів, має значення, в якій частині “відкритого поля” відбувається дослідницька активність. Тварини за вищого рівня стресу більшу частину часу перебувають на периферії “відкритого поля” [6], тоді як відвідування центральних квадратів відображає звикання до середовища і характерне для тварин за менш вираженої тривожності [3]. Іншими показниками дослідницької поведінки, що корелюють

з тяжкістю травми та ефективністю лікувальних заходів, є кількість вертикальних стійок та заглядань у нірки [20]. Емоційні стани супроводжуються різними вегетативними проявами. Вегетативною функцією, яку зручно досліджувати поряд з оцінкою активності, є дефекація. Реакція дефекації в тесті “відкритого поля” є достовірним показником збудження вегетативної нервової системи і, отже, емоційної реакції тварини [21]. Тварин, які менше пересуваються і в яких спостерігають більш часту дефекацію в ситуації “відкритого поля”, вважають більш емоційними, ніж тих, що багато пересуваються, проте, з меншою частотою дефекації [22].

Застосування тесту “відкритого поля” свідчить, що експериментальна ЧМТ викликає у щурів стійкий дефіцит спонтанної дослідницької поведінки, який зберігається без тенденції до регресу на 7-му [16], 14-ту [3, 23], 28-му [14, 15], 42-гу добу [11] і навіть через 3 міс [1] після травми. На підставі цього зроблений висновок, що цей метод можна використовувати для дослідження вираженості стресу й тривожності після експериментальної ЧМТ і оцінки ефективності лікувальних заходів [1]. Дослідження у “відкритому полі” щурів, розподілених на групи за рівнем емоційності й темпераменту (показником ентропії поведінки), показало, що в гострому періоді механічної травми їх поведінка одноманітна й збіднена, вони малорухливі, дослідницька активність знижена [24].

Загалом, дослідження нових об'єктів і обстановки належить до тих характеристик поведінки тварини, які надзвичайно бажані для вивчення, адже, воно ґрунтується на природній дослідницькій поведінці тварини і не потребує додаткової позитивної чи негативної стимуляції. Дослідження нових об'єктів чи навколишнього простору ґрунтується на притаманній тваринам поведінці, яка не потребує досягнення певної специфічної мети. Відзначають кілька чинників, що зумовлюють дослідницьку поведінку, це природний дослідницький стимул (drive), оптимальний рівень збудження (arousal) і рівень страху/стресу [25]. Інтактні тварини при зміні навколишньої обстановки віддають перевагу дослідженню нового простору чи об'єкту на відміну від тих, що вже відомі. Таким чином, дослідницька поведінка може бути відображенням механізму формування пам'яті про новий простір чи об'єкт [26]. Вплив стресу/тривожності на поведінку тварини у “відкритому полі” полягає в тому, що дослідження нового є наслідком вибору в конфлікті між природним бажанням досліджувати навколишнє середовище і страхом перед відкритим простором [1].

Незважаючи на широке висвітлення в літературі поширеності й клінічної характеристики посттравматичних афективних розладів, патофізіологічні механізми, що лежать в їх основі, недостатньо вивчені [1].

За даними літератури, функціональний дефіцит після ЧМТ пов'язаний з кількома механізмами. Механічне пошкодження тканини у вигляді розривів, розтягнення та зсувної деформації (“shearing”) нейронів у момент травми відоме як *первинне пошкодження*. У подальшому виникає каскад нейрохімічних і нейрофізіологічних змін, що зумовлює пошкодження нейронів за масштабом значно більше, ніж первинне пошкодження. Цей процес, який спричиняє *вторинне пошкодження* мозку, відбувається за кількома напрямками, що включають запалення, оксидантний стрес, іонний дисбаланс, підвищення

проникності судин, дисфункцію мітохондрій. Ці процеси зумовлюють набряк головного мозку, підвищення внутрішньочерепного тиску, порушення мозкової перфузії. Таке поєднання змін клітинних структур і фізіологічних процесів є причиною інтенсивної загибелі нервових клітин шляхом екайотоксичності (некрозу) та апоптозу, збільшення обсягу пошкодження та формування функціонального дефіциту — неврологічних і функціональних наслідків травми [23, 27, 28]. З іншого боку, оскільки вторинне пошкодження мозку після ЧМТ є тривалим процесом, що еволюціонує протягом годин, днів і навіть місяців, існування такого “терапевтичного вікна” уможливило застосування методів лікування, спроможних гальмувати вторинне пошкодження та нівелювати наслідки травми [15].

Останнім часом виникнення депресії та інших афективних розладів після ЧМТ пов'язують з двобічною дисфункцією лобових і скроневих часток головного мозку та пошкодженням глибоких дienceфальних структур і мереж, наслідком чого є порушення фізіологічних рівнів нейротрансмітерів. За вогнищевого забою мозку можливе безпосереднє ураження структур мозку, що забезпечують настрої та емоції, зокрема, скроневі частки та лобову кору. Дифузне пошкодження аксонів, крім прямого ураження нейрональних мереж, спричиняє дисфункцію нейротрансмітерних систем, зокрема, норадреналінової, серотонінової, дофамінової та ацетилхолінової. Доведено, що таке ураження є часткою вторинного пошкодження мозку після ЧМТ [11, 29, 30]. Беручи до уваги, що дофамінергічна система задіяна в реалізації дослідницької поведінки, ми поряд з А.К. Wagner та співавторами [3], які вивчали вплив ЧМТ (“контрольованого ураження кори”) на здатність досліджувати нове середовище, можемо констатувати, що ЧМТ (в нашому дослідженні — дифузне пошкодження аксонів) зумовлює пошкодження дофамінергічних структур і провідних шляхів, які забезпечують окреслення завдань й мотивацію та необхідні для цілеспрямованої взаємодії з новим об'єктом і дослідження нового навколишнього простору. Такою структурою є, зокрема, прилегле ядро (nucleus accumbens). Це припущення підтверджується даними досліджень, які свідчать, що ЧМТ спричиняє тривалі розлади експресії рецепторів дофаміну у смугастому тілі та в проєкційних зонах дофамінергічної іннервації в лобовій корі [31, 32]. Крім того, ураження корково-підкоркових провідних шляхів і структур, що модулюють загальну рухову активність, зокрема, хвостатого ядра, може сприяти зниженню загальної активності, яке виявляють під час дослідження поведінки тварини у “відкритому полі” після ЧМТ [3].

Нейротрансмітери і нейропептиди, інші, ніж дофамін, також можуть опосередковувати порушення дослідницької поведінки у “відкритому полі” після ЧМТ. Наприклад, виснаження норадреналінової нейротрансмісії, яке корелює з підвищеним рівнем тривожності та пригніченням дослідницької поведінки [33], відбувається одразу після травми [34], а відновлення норадренергічної системи є проявом одужання після експериментальної ЧМТ [35]. Також, за експериментальної ЧМТ спостерігають збільшення вмісту нейропептиду холецистокініну [36], тоді як збільшення щільності рецепторів до цієї сполуки пов'язане з підвищеною тривожністю [37].

Цікаві дані, що пов'язують появу афективних розладів з ефектами запалення й нейропластичної реорганізації нейронних мереж після ЧМТ, наводять N.C. Jones та співавтори [1]. У виникненні посттравматичних афективних розладів можуть брати участь прозапальні цитокіни, вміст яких збільшується у тканині мозку після ЧМТ. Відповідно до гіпотези G. Spalletta і співавторів [38], збільшення продукції інтерлейкінів 1b, 18, а також фактору некрозу пухлин- α зумовлює активацію запалення, особливо в лімбічних ділянках, і поширену активацію ферменту індоламін 2,3-діоксигенази з подальшим пригніченням продукції серотоніну в паралімбічних відділах, зокрема, вентролатеральній лобовій корі, скронево-полюсній корі та базальних гангліях. Той факт, що ЧМТ може спричинити формування посттравматичної епілепсії, початок якої спостерігають через місяці або роки після травми, свідчить про наявність нейропластичної структурної та функціональної реорганізації, зокрема, в гіпокампі і мигдалинах — структурах, задіяних у формуванні афективних розладів. Виявлення за даними гістологічного дослідження мозку пацієнтів, що за життя перенесли ЧМТ, ознак пошкодження, атрофії тканини й загибелі клітин у гіпокампі, таламусі, сомато-сенсорній корі, свідчать про їх можливу участь у розладах поведінки.

Відсутність звикання до “відкритого поля”, що також може спричинити зниження рухової активності й дослідження навколишнього середовища, може бути зумовлена також розладами пам'яті, виявленими в цій моделі ЧМТ [39]. Пояснюючи зв'язок розладу пам'яті та змін поведінки тварини у “відкритому полі” після ЧМТ, A.K. Wagner та співавтори [3] наводять власні результати і дані літератури про те, що смугасте тіло відіграє роль інтегратора інформації для інших структур, зокрема, гіпокампу, а за травматичного ураження дофамінергічної іннервації в смугастому тілі порушується його функція. Також слід відзначити, що при пошкодженні гіпокампу, виявленому при ЧМТ на моделі “ударного прискорення”, спостерігали дефіцит пам'яті [4, 22, 39].

Оскільки основними детермінантами дослідницької поведінки є рухова активність і рівень тривожності, зниження рухової активності у “відкритому полі” може відображати наявність у тварини посттравматичного рухового дефіциту [23]. Дані літератури свідчать, що в застосованій нами моделі “ударного прискорення” дефіцит рухової функції є тимчасовим, повне її відновлення відбувається до 10-ї доби після травми у щурів, яким не проведено лікування [11]. Крім того, використана нами модель ЧМТ характеризується наявністю дифузного пошкодження аксонів, що, крім прямого руйнування нейронних мереж, спричиняє порушення таких нейротрансмітерних систем, як норадреналінова, серотонінова та ацетилхолінова, це зумовлює появу розладів емоцій та поведінки [30]. Таким чином, зниження дослідницької поведінки у “відкритому полі” на 10-ту добу після травми також не може бути ознакою стійкого неврологічного дефіциту, а відображає наявність такого тривалого наслідку ЧМТ, як підвищений рівень стресу й тривожності.

Одержані нами дані свідчать, що за експериментальної ЧМТ виникає помітне зниження дослідницької поведінки й емоційного стану, що є відображенням підвищеного рівня стресу й тривожності у тварин.

Це спостереження має суттєве значення для клініки, оскільки, з огляду на значне поширення афективних розладів після ЧМТ у людини, вони можуть мати, принаймні частково, нейробіологічну основу.

Результати дослідження свідчать, що застосування генної терапії, спрямованої на індукцію синтезу в нервовій тканині ізоформи $\epsilon 3$ апоЕ, сприяє значному зменшенню вираженості функціонального дефіциту, що виникає після тяжкої дифузної ЧМТ у щурів. Те, що достовірні дані отримані на невеликій кількості тварин, використаних у дослідженні, свідчать про незаперечну вираженість такого лікувального ефекту. Наші дані підтверджують зв'язок функціонального ефекту ліпосомальної трансфекції геном апо Е3 з виявленням позитивним впливом методу на структурні прояви травми, що проявлялися гальмуванням розвитку вторинного ураження мозку, зменшенням вираженості деструктивно-дистрофічних змін, зумовлених ЧМТ, нормалізацією структури й ультраструктури гіпокампу, зменшенням загибелі нейронів, ступеня дифузного пошкодження аксонів, гліозу й мікрогліальної реакції, реактивного набряку головного мозку. Усе це підтверджує концепцію, що функціональні наслідки травми корелюють з обсягом ураження мозку [15].

Цікавим результатом, який було одержано в нашому дослідженні, є достовірне зниження дослідницької поведінки в псевдооперованих щурів групи Пл. Операція з накладання фрезевого отвору й встановлення внутрішньошлуночкової канюлі з супутніми зміною обстановки, операційними травмами та стресом, наркозом і т.п. призводила до наявності в цих тварин на 7-у добу експерименту певного рівня стресу й тривожності, що суттєво не відрізнявся від результатів групи ЧМТ+Пл (травмованих щурів, що одержували лікування за допомогою генної терапії). Цей факт, що стався, незважаючи на очікуваний лікувальний ефект введення в головний мозок плазмідного вектору з геном апо Е3, потребує, можливо, додаткового дослідження та пояснення.

Висновки 1. Тяжка дифузна ЧМТ у щурів, відтворена за допомогою “моделі ударного прискорення”, характеризується вираженим порушенням дослідницької поведінки й емоційного стану тварин, що відображає наявність у них підвищеного рівня стресу й тривожності.

2. Застосування ліпосомальної трансфекції клітин ЦНС плазмідним вектором, що несе ген ізоформи $\epsilon 3$ апоЕ людини, сприяло регресові посттравматичних розладів дослідницької поведінки й емоційного стану та відновленню порушених функцій.

3. Генна терапія є перспективним методом лікування ЧМТ в експерименті, що справляє позитивний вплив на перебіг спричинених нею функціональних розладів.

Список літератури

1. Experimental traumatic brain injury induces a pervasive hyperanxious phenotype in rats / N.C. Jones, L. Cardamone, J.P. Williams [et al.] // *J. Neurotrauma*. — 2008. — V.25. — P.1367–1374.
2. Moore E.L. Mild traumatic brain injury and anxiety sequelae: a review of the literature / E.L. Moore, L. Terryberry-Spohr, D.A. Hope // *Brain Injury*. — 2006. — V.20. — P.117–132.
3. Deficits in novelty exploration after controlled cortical impact / A.K. Wagner, B.A. Postal, S.D. Darrach [et al.] //

- J. Neurotrauma. — 2007. — V.24. — P.1308–1320.
4. 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.
 5. Larsson F. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats / F. Larsson, B. Winblad, A.H. Mohammed // Pharmacol. Biochem. Behav. — 2002. — V.73. — P.193–207.
 6. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion / M. Vallee, W. Mayo, F. Dellu [et al.] // J. Neurosci. — 1997. — V.17. — P.2626–2636.
 7. Brain-derived neurotrophic factor administration after traumatic brain injury in the rat does not protect against behavioral or histological deficits / G.R. Blaha, R. Raghupathi, K.E. Saatman [et al.] // Neuroscience. — 2000. — V.99. — P.483–493.
 8. Carbonell W.S. Regional and temporal characterization of neuronal, glial, and axonal response after traumatic brain injury in the mouse / W.S. Carbonell, M.S. Grady // Acta Neuropathol. — 1999. — V.98. — P.396–406.
 9. Jorge R.E. Pathophysiologic aspects of major depression following traumatic brain injury / R.E. Jorge, S.E. Starkstein // J. Head Trauma Rehabil. — 2005. — V.20. — P.475–487.
 10. Psychiatric challenges in the first 6 years after traumatic brain injury: cross-sequential analyses of Axis I disorders / T.A. Ashman, L.A. Spielman, M.R. Hibbard [et al.] // Arch. Phys. Med. Rehabil. — 2004. — V.85. — P.36–42.
 11. Magnesium attenuates post-traumatic depression/anxiety following diffuse traumatic brain injury in rats / L. Fromm, B. Pharm, D.L. Heath [et al.] // J. Am. Coll. Nutr. — 2004. — V.23, N5. — P.529–533.
 12. Morton M.V. Psychosocial and emotional sequelae of individuals with traumatic brain injury: a literature review and recommendations / M.V. Morton, P. Wehman // Brain Injury. — 1995. — V.9. — P.81–92.
 13. Depression-like and anxiety-like behavioural aftermaths of impact accelerated traumatic brain injury in rats: A model of comorbid depression and anxiety? / D.K. Pandey, S.K. Yadav, R. Mahesh [et al.] // Behav. Brain Res. — 2009. — V.205, N2. — P.436–442.
 14. Effects of daily versus weekly testing and pre-training on the assessment of neurologic impairment following diffuse traumatic brain injury in rats / C. O'Connor, D.L. Heath, I. Cernak [et al.] // J. Neurotrauma. — 2003. — V.10, N6. — P.985–993.
 15. Magnesium attenuates persistent functional deficits following diffuse traumatic brain injury in rats / R. Vink, C.A. O'Connor, A.J. Nimmo [et al.] // Neurosci. Lett. — 2003. — V.336. — P.41–44.
 16. O'Connor C.A. Interaction between anesthesia, gender, and functional outcome task following diffuse traumatic brain injury in rats / C.A. O'Connor, I. Cernak, R. Vink // J. Neurotrauma. — 2003. — V.20, N6. — P.533–541.
 17. Kulkarni S. Open Field Test: its status in psychopharmacology / S. Kulkarni // Ind. J. Pharmacol. — 1977. — V.9. — P.241–246.
 18. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: A review / J. Archer // Animal. Behav. — 1973. — V.21. — P.205–235.
 19. Cyclosporine A affects open field behavior in DA rats / S. Von Horst, M. Exton, J. Voge [et al.] // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1998. — V.60. — P.71–76.
 20. Волохова Г. А. Влияние солкосерила на вызванные черепно-мозговой травмой электрографические изменения и поведение крыс / Г.А. Волохова, А.Н. Стоянов // Міжнар. неврол. журн. — 2008. — №2. — С.51–57.
 21. Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте “открытого поля” / А.Л. Маркель // Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова. — 1981. — Т.31, №2. — С.301–307.
 22. Буреш Я. Открытое поле / Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. П. Хьюстон; пер. с англ. Е.Н. Живописцевой // Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М.: Высш. шк., 1991. — С.119–121.
 23. Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats / U. Sonmez, A. Sonmez, G. Erbil [et al.] // Neurosci. Lett. — 2007. — V.420. — P.133–137.
 24. Индивидуально-типологические особенности поведения крыс после легкой механической травмы / Ю.Н. Шанин, В.Н. Цыган, Ж.Г. Александрова, Н.Б. Суворов // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 1987. — №1. — С.9–11.
 25. Hughes R. Intrinsic exploration in animals: motives and measurement / R. Hughes // Behav. Processes. — 1997. — V.41. — P.213–226.
 26. Sutcliffe J.S. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat / J.S. Sutcliffe, K.M. Marshall, J.C. Neill // Behav. Brain Res. — 2007. — V.177. — P.117–125.
 27. Bramlett H.M. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences / H.M. Bramlett, W.D. Dietrich // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2004. — V.24. — P.133–150.
 28. Leker R.R. Cerebral ischemia and trauma — different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities / R.R. Leker, E. Shohami // Brain Res. Rev. — 2002. — V.39. — P.55–73.
 29. McIntosh T.K. Neurochemical sequelae of traumatic brain injury / T.K. McIntosh // Cereb. Brain Metab. Rev. — 1994. — V.6. — P.109–162.
 30. Van Reekum R. Can traumatic brain injury cause psychiatric disorders? / R. Van Reekum, T. Cohen, J. Wong // J. Neuropsychiat. Clin. Neurosci. — 2000. — V.12. — P.316–327.
 31. Controlled cortical impact injury affects dopaminergic transmission in the rat striatum / A.K. Wagner, J.E. Sokolovski, D. Ren [et al.] // J. Neurochem. — 2005. — V.95. — P.457–465.
 32. Gender and environmental enrichment impact dopamine transporter expression after experimental traumatic brain injury / A.K. Wagner, X. Chen, A.E. Kline [et al.] // Exp. Neurol. — 2005. — V.195. — P.475–483.
 33. Novelty seeking and stereotypic activation on behavior in mice with disruption of the Dat1 gene / V.M. Pogorelov, R.M. Rodriguiz, M.L. Insko [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2005. — V.30. — P.1818–1831.
 34. Regional levels of lactate and norepinephrine after experimental brain injury / M.R. Prasad, C. Ramaiah, T.K. McIntosh [et al.] // J. Neurochem. — 1994. — V.63. — P.1086–1094.
 35. Boyeson M.G. Intraventricular norepinephrine facilitates motor recovery following sensorimotor cortex injury / M.G. Boyeson, D.M. Feeney // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1990. — N5. — P.497–501.
 36. Elevated cholecystokinergic tone constitutes an important molecular/neuronal mechanism for the expression of anxiety in the mouse / Q. Chen, A. Nakajima, C. Meachem [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — V.103. — P.3881–3886.
 37. Increase of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF binding protein-2, and -4 mRNAs following cerebral contusion / A.-C.S. Nordqvist, H. von Holst, S. Holmin [et al.] // Mol. Brain Res. — 1996. — V.38. — P.285–293.
 38. The etiology of poststroke depression: a review of the literature and a new hypothesis involving inflammatory cytokines / G. Spalletta, P. Bossu, A. Ciaramella [et al.] // Mol. Psychiatry. — 2006. — V.11. — P.984–991.
 39. Влияние липосомальной трансфекции гена аполипопротеина Е3 на динамику неврологического и когнитивного дефицита при черепно-мозговой травме в эксперименте / В.В. Белошицкий, Н.Я. Гридина, Л.А. Цыба [и др.] // Укр. нейрохірург. журн. — 2009. — №2. — С.59–63.

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

Вплив ліпосомальної трансфекції в клітини головного мозку гену апо Е3 на дослідницьку поведінку та емоційний стан щурів після експериментальної черепно-мозкової травми

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м.Київ,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м.Київ

Мета роботи — дослідження ступеня порушень дослідницької поведінки й емоційного стану щурів за тяжкої дифузної черепно-мозкової травми (ЧМТ) в експерименті, а також можливостей корекції зазначених змін за допомогою 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 вагою 450 г з висоти 1,5 м. Внутрішньочлункову інфузію катіонних ліпосом DOTAP, що несли 25 мкг плазмідного вектору рCMV·SPORT6 з кДНК гену АРОЕ3, здійснювали за допомогою осмотичних помп ALZET. Дослідницьку поведінку й емоційний стан щурів експериментальних та контрольної груп вивчали на 7-му добу після травми в тесті “відкрите поле”. Результати дослідження свідчили, що тяжка дифузна ЧМТ у щурів характеризується вираженим порушенням дослідницької поведінки й емоційного стану, що відображає наявність у них підвищеного рівня стресу й тривожності. Застосування ліпосомальної трансфекції головного мозку плазмідним вектором, що несе ген ізоформи ε3 аполіпопротеїну Е, сприяло регресові посттравматичних порушень дослідницької поведінки й емоційного стану та відновленню порушених функцій.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, генна терапія, аполіпопротеїн Е, дослідницька поведінка, емоційний стан, “відкрите поле”, експеримент.

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

Влияние липосомальной трансфекции в клетки головного мозга гена апо Е3 на исследовательское поведение и эмоциональное состояние крыс после экспериментальной черепно-мозговой травмы

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

Цель работы — исследование степени нарушения исследовательского поведения и эмоционального состояния крыс при тяжелой диффузной черепно-мозговой травме (ЧМТ) в эксперименте, а также возможности коррекции указанных изменений с помощью генной терапии, направленной на индукцию синтеза в нервной ткани изоформы ε3 аполипопротеина Е. Тяжелую ЧМТ наносили крысам под общей анестезией путем свободного падения груза весом 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 помп ALZET. Исследовательское поведение и эмоциональное состояние крыс экспериментальных и контрольной групп изучали на 7-е сутки после травмы в тесте “открытое поле”. Результаты исследования показали, что тяжелая диффузная ЧМТ у крыс характеризуется выраженными нарушениями исследовательского поведения и эмоционального состояния животных, что отражает наличие у них повышенного уровня стресса и тревожности. Применение липосомальной трансфекции головного мозга плазмидным вектором, несущим ген изоформы ε3 аполипопротеина Е, способствовало регрессу посттравматических нарушений исследовательского поведения и эмоционального состояния, а также восстановлению нарушенных функций.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, генная терапия, аполипопротеин Е, исследовательское поведение, эмоциональное состояние, “открытое поле”, эксперимент.

Biloshytskiy V.V., Velichko O.M., Gridina N.Ya., Tsyba L.O., Pedachenko E.G.

The influence of liposome-mediated APOE3 gene transfection in brain cells on exploratory behavior and emotionality of rats after experimental traumatic brain injury

Institute of neurosurgery named after A.P. Romodanov
of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev,
Institute of molecular biology and genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

The goal of study was to estimate in the experiment the levels of exploratory behavior and emotionality disorders of rats with severe diffuse traumatic brain injury (TBI), and also possibilities of such disorders correction using gene therapy that launches $\epsilon 3$ synthesis in brain tissue — isoform of apolipoprotein E. Severe diffuse TBI in rats was inflicted under overall anesthesia by free load weighting 450 g, falling from 1.5 m height. 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. The exploratory behavior and emotionality of rats in experimental and control groups were studied in open field test 7 days after trauma. The obtained results demonstrated that severe diffuse TBI in rats was characterized by evolution of evident exploratory behavior and emotionality disorders that reflected stress and anxiety increasing. The liposome-mediated brain tissue transfection with plasmid vector carrying the gene of apolipoprotein E $\epsilon 3$ isoform caused regress of posttraumatic exploratory behavior and emotionality disorders and recovery of affected functions.

Key words: *traumatic brain injury, gene therapy, apolipoprotein E, exploratory behavior, emotionality, open field, experiment.*

Коментар

до статті Білошицького В.В. і співавторів “Вплив ліпосомальної трансфекції в клітини головного мозку гену apo E3 на дослідницьку поведінку та емоційний стан щурів після експериментальної черепно-мозкової травми”

Стаття присвячена актуальній темі — вдосконаленню лікування розладів психічної сфери після черепно-мозкової травми.

Ген apoE має три алелі: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ та $\epsilon 4$, в сучасній науковій літературі характеризується не тільки як прогностичний фактор підвищеного ризику виникнення хвороби Альцгеймера а й як ген, що бере участь у метаболізмі глюкози в ЦНС, синаптогенезі, нейрональній пластичності та репарації.

Доведено, що ендогенний apoE в ЦНС виконує важливі адаптивні функції після травмування: запобігає виникненню запалення та пошкодженню від збуджуючих нейромедіаторів. Вважають, що роль apoE у захисті нервової тканини від пошкодження настільки важлива,

що в майбутньому необхідно переглянути терапевтичну стратегію при гострих та хронічних неврологічних розладах з огляду на apoE. ApoE вважають одним з білків, безпосередньо пов'язаних з когнітивною функцією, тому вивчення дослідницької поведінки та емоційного стану як доказу терапевтичного ефекту трансфекції ApoE обґрунтоване, отримані результати доводять надійність та інформативність проведених тестів.

З огляду на високу активність досліджень в галузі практичного використання apoE для відновлення функції ЦНС в світі, робота авторів є актуальною, заслуговує позитивної оцінки. Важливо також відзначити, що автори використовували метод генної терапії, набуття такого досвіду для української науки дуже важливе.

*Васильєва І.Г., кандидат біологічних наук
завідуюча відділом нейробіохімії*

Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України