

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

Інститут нейрохірургії  
ім. акад.  
А.П.Ромоданова АМН  
України (Київ)  
Інститут молекулярної  
біології і генетики НАН  
України (Київ)

**Ключові слова:** черепно-мозкова травма, генна терапія, апоЕ2, плазмідний вектор, катіонні ліпосоми.

Надійшла: 20.10.2009  
Прийнята: 16.12.2009

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

## ВПЛИВ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ТРАНСФЕКЦІЇ ПЛАЗМІДНИМ ВЕКТОРОМ З ГЕНОМ апоЕ2 НА СТРУКТУРНІ ЗМІНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВІЙ ТРАВМІ

**Резюме.** Вивчено можливість попередження розвитку структурних змін головного мозку, обумовлених його вторинними ушкодженнями при черепно-мозковій травмі, за допомогою генної терапії, направленої на індукцію синтезу в нервовій тканині ізоформи ε2 АпоЕ. Тяжку черепно-мозкову травму наносили щурам під загальною анестезією шляхом вільного падіння вантажу масою 450 г з висоти 1,5 м. Внутрішньощлуночкова інфузія катіонних ліпосом DOTAP, що містили 25 мкг плазмідного вектору рCMV•SPORT6 з кДНК гену апоЕ2, здійснювали за допомогою осмотичних pomp ALZET. Гістологічне дослідження головного мозку виконували на 10-ту добу після травми. Ліпосомна трансфекція тканини мозку щурів з черепно-мозковою травмою плазмідним вектором з геном апоЕ2 забезпечувала протекторну дію на судинну систему і паренхіму мозку, попереджала формування зон вторинної дезінтеграції у травмованому мозку. Про це свідчило значне зменшення (до слідової) вираженості ознак порушення проникності капілярів і пошкодження паренхіми мозку, реактивного набряку мозку пролікованих тварин.

**Морфологія.** – 2009. – Т. III, № 4. – С. 55-61.

© Є.Г.Педаченко, В.В.Білошицький, В.М.Семенова, Н.Я.Гридіна, Л.О.Циба, 2009

**Pedachenko E.G., Biloshytsky V.V., Semenova V.M., Gridina N.Ya., Tsyba L.O. The influence of cationic liposome-mediated APOE2 gene transfer on brain structural changes after experimental traumatic brain injury.**

**Summary.** The possibilities to prevent the evolution of structural changes caused by secondary damage after traumatic brain injury by means of gene therapy aimed at the induction of apoE2 synthesis in brain tissue were studied. Traumatic brain injury in rats was inflicted under an overall anesthesia by free falling 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 APOE2 gene was infused intraventricularly. At day 10 after traumatic brain injury the histological examination of brain tissue was performed. Cationic liposome-mediated APOE2 gene transfer protected the brain parenchyma and vascular system and prevented the evolution of secondary injuries in damaged brain.

**Key words:** traumatic brain injury, gene therapy, apoE2, plasmid vector, cationic liposome.

### Вступ

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) продовжує залишатися актуальною проблемою сучасного суспільства й медицини. Згідно з даними Національного інституту неврологічних розладів та інсульту (США) ([www.ninds.nih.gov](http://www.ninds.nih.gov)) тільки в Сполучених Штатах 270 тисяч людей щороку переносять середньотяжку чи тяжку ЧМТ, наслідком чого є 270 тисяч смертей і 80 тисяч випадків тяжкої інвалідності. У Китаї приймальні відділення повідомляють про 1 мільйон випадків ЧМТ щороку, що призводять до смерті 100 тисяч потерпілих (Chen X. et al., 2009). В Україні в середині 90-х рр. 20 сторіччя частота ЧМТ у різних регіонах коливалась від 2,3% до 6%, складаючи в середньому 4,0-4,2%, тобто кількість потерпілих сягала 200 тисяч осіб на рік (Педаченко Є.Г.,

Морозов А.М., 1993).

Одним із перспективних методів нейропротекції при ЧМТ може бути генна терапія – метод, що дозволяє індукувати в клітинах ушкодженого мозку синтез тих чи інших білків з потенціальним терапевтичним ефектом.

Аполіпопротеїн Е (апоЕ означає ген, АпоЕ – білок) – глікопротеїн плазми крові, що відіграє провідну роль у метаболізмі, транспорті й регуляції рівня холестерину й тригліцеридів. Після ЧМТ синтез АпоЕ набуває найважливішого значення для репарації ліпідного компоненту мембран нейронів і гліоцитів, забезпечуючи транспорт холестеролу й фосфоліпідів у процесі реінервації. При ЧМТ у АпоЕ – дефіцитних тварин виявляють грубіші структурні зміни й гірші функціональні наслідки (Chen X. et al., 1997; Lynch

J.R., 2002).

У людини існує 3 ізоформи білка АпоЕ –  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  та  $\epsilon 4$ , що відрізняються наявністю аргініну чи цистеїну в 112-й і 158-й позиціях послідовності амінокислот. Спочатку алель апоЕ4 було ідентифіковано як фактор ризику виникнення хвороби Альцгеймера. Було доведено, що носійство алелю апоЕ4 супроводжується дисфункцією ліпід-транспортних систем і виникненні ЧМТ пов'язане з гіршим ростом нейритів і ремоделюванням синапсів. Носійство алелю апоЕ4 прямо корелює з наявністю масивніших структурних змін при ЧМТ у людини, гіршими наслідками травми, виникненням віддалених наслідків, зокрема хвороби Альцгеймера (Педаченко Е.Г. и соавт., 2003).

Можливість вплинути на баланс внутрішньоклітинних процесів, які, з одного боку, реалізують ефекти первинної травми й наступного вторинного пошкодження мозку, а з іншого боку, забезпечують регенеративно-репаративні процеси в ЦНС, нині надається шляхом трансферу в клітини травмованого мозку гену АпоЕ2 (АпоЕ2 – ген, що кодує ізоформу  $\epsilon 2$  АпоЕ).

#### **Мета**

Метою роботи було дослідження можливості попередити розвиток структурних змін головного мозку, обумовлених його вторинними ушкодженнями при ЧМТ, за допомогою генної терапії, направленої на індукцію синтезу в нервовій тканині ізоформи  $\epsilon 2$  АпоЕ.

#### **Матеріал та методи**

Дослідження виконано на дорослих щурах-самцях лінії Wistar, маса тіла яких складала від 350 до 400 г, з віварію Інституту нейрохірургії. Тварин було розподілено на 3 групи (по 5 щурів).

Контроль-1 – тваринам не завдавали ЧМТ і не виконували будь-яких хірургічних маніпуляцій з хірургічною метою (інтактні).

Контроль-2 – тваринам завдавали експериментальну ЧМТ і встановлювали в лівий боковий шлуночок канюлю, яку з'єднували з встановленим під шкіру резервуаром (осмотичною помпою), який заповнювали ізотонічним розчином натрію хлориду замість лікарського препарату.

Дослід – тваринам завдавали експериментальну ЧМТ і встановлювали в лівий боковий шлуночок канюлю, з'єднували її встановленим під шкіру резервуаром (осмотичною помпою), для внутрішньошлуночкової інфузії катіонних ліпосом з плазмідним вектором, який ніс ген АпоЕ2 у післятравматичному періоді.

Завдання експериментальної ЧМТ і всі хірургічні маніпуляції виконували під загальним наркозом, який забезпечувався внутрішньоочеревинним введенням розчину тіопентал-натрію (50 мг/кг). По завершенню експерименту, на 10-у добу, тварин умертвляли шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції розчину тіопентал-натрію (200 мг/кг).

Моделювання ЧМТ. Для відтворення в щурів тяжкої дифузної ЧМТ використовували «модель ударного прискорення» (impact acceleration model) (Marmarou A. et al., 1994; Yang X.Y. et al., 2002). Під загальною анестезією виконували поздовжній розріз шкіри голови завдовжки 2 см по середній лінії з оголенням брегми (точки перетину коронарного й сагітального швів черепа) і лямбди (точки перетину сагітального й лямбдовидного швів). Склепіння черепа щура оголювали за допомогою распатора, висушували поверхню, до кістки міцно за допомогою зубного цементу фіксували так званий «шолом» – круглу сталеву платівку діаметром 1 см – у серединному положенні між коронарним і лямбдовидним швами. Травму завдавали шляхом падіння з висоти 1,5 м вантажу вагою 450 г з тупою поверхнею, що забезпечувало прискорення голови при мінімальному локальному впливові в точці прикладання травматичної сили.

Створення векторних конструкцій для генної терапії. У роботі було використано кДНК гену апоЕ2 людини, субклоновану в вектор рUC18, надану професором G. Dickson та дослідником Т. Athanasopoulos (факультет біохімії Королівського Лондонського університету, Велика Британія) і вектор рCMV•SPORT6 (“Invitrogen”, США), що має цитомегаловірусний промотор і сигнал поліаденілування SV40, що дозволяє експресувати клоновану в ньому послідовність ДНК в еукаріотичних клітинах. кДНК гену апоЕ2 переклонували в вектор рCMV•SPORT6 по сайтах рестриктаз Smal і SalI, вектор обробляли рестриктазами HindIII і SalI, при цьому кінці ДНК після обробки рестриктазою HindIII затуплювали за допомогою фрагмента Кленова. Одержану конструкцію рCMV•SPORT6-АПОЕ3 виділяли в препаративних кількостях методом лужного лізису, використовуючи реактиви й колонки тіп 500 фірми “Qiagen” (США).

Внутрішньошлуночкова інфузія плазмідного вектору з геном апоЕ2. Для доставки препарату в головний мозок щурів після заподіяння ним травми використовували «Набори для мозкових інфузій» і осмотичні помпи ALZET (виробництво DURECT Corp., США). Десять осмотичних помп заповнювали згідно з інструкцією виробника: 5 – ізотонічним розчином натрію хлориду (група Контроль-2), 5 – препаратом катіонних ліпосом з плазмідним вектором, що несе ген апоЕ2 (група Дослід). Використовували модель помпи 2001D, що забезпечує безперервну інфузію зі швидкістю 8 мкл/год упродовж 25 годин, що складало сумарно близько 200 мкл. Щурам групи Дослід виконували внутрішньошлуночкову інфузію 25 мкг плазмідної ДНК. Комплекс катіонних ліпосом/ДНК готували з використанням препарату катіонних ліпідів DOTAP Methosulfate (5 мкл на 1 мкг ДНК) згідно з інструкцією виробника

(Sigma-Aldrich, США). Систему, що складалась із канюлі, катетера й осмотичної помпи, складала у відповідності до інструкції виробника. Відразу після завдання травми голову тварини фіксували в стереотаксичному апараті. «Шолом» і зубний цемент видаляли. У підшкірному просторі на спині тварини, починаючи від нижнього краю розрізу й далі через міжлопатковий простір, корнцангом формували карман для осмотичної помпи. У проекції переднього рогу лівого бокового шлуночка за допомогою бормашини круглою фрезою на кістку склепіння черепа накладали фрезевий отвір. Використовували такі стереотаксичні координати переднього рога бокового шлуночка: позаду від брегми – 0,8 мм, латерально – 1,5 мм, дорсовентрально – 4,8 мм (Kotapka M.J. et al., 1994). Канюлю встановлювали у фрезевий отвір. Попадання кінчика канюлі в просвіт лівого бокового шлуночка, на необхідну глибину в 4,8 мм, забезпечувалось довжиною канюлі (5мм). Канюлю фіксували до поверхні черепа зубним цементом. Осмотичну помпу занурювали в підшкірний карман. На рану шкіри накладали шви атравматичною ниткою. Тварину виймали із стереотаксичного апарату й поміщали до клітки.

Гістологічне дослідження. Для порівняльного гістологічного дослідження структурних змін у мозку тварин різних груп щурів умертвляли через 10 діб після завдання травми шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції летальної дози тіопентал-натрію (200 мг/кг). Мозок обережно вилучали з порожнини черепа, макроскопічно оцінювали стан м'яких оболонок, рельєфу, наявності крововиливів, локалізацію видимих осередків забою. Мозок фіксували в 20% розчині нейтрального формаліну. Із фіксованого мозку вирізали фронтальні блоки, які обробляли за стандартною методикою. Із одержаних блоків виготовляли серійні зрізи товщиною 5-7 мкм, які фарбували гематоксиліном і еозином, гематоксиліном і пікрофусцином та тіоніном за Ніслем – для селективного виявлення тонкої структури нейронів. Гістологічні препарати мозку експериментальних тварин вивчали за допомогою цитоаналізатора зображення «Ibas-2000» з наступною фотореєстрацією.

#### Результати та їх обговорення

Для тканини головного мозку щурів групи Контроль-2 (ЧМТ без лікування) за даними гістологічного дослідження були характерні ділянки фрагментарного відшарування м'яких оболонок головного мозку, їхнє набухання й розшарування дифузно-вогнищевими, нерідко масивними скупченнями змінених еритроцитів (рис. 1). Такі зміни відзначали на значній відстані як конвексимальної, так і базальної поверхні мозку. Подекуди в надоболонковому й підоболонковому просторах спостерігали геморагічні маси з наявністю грудок гемосидерина.

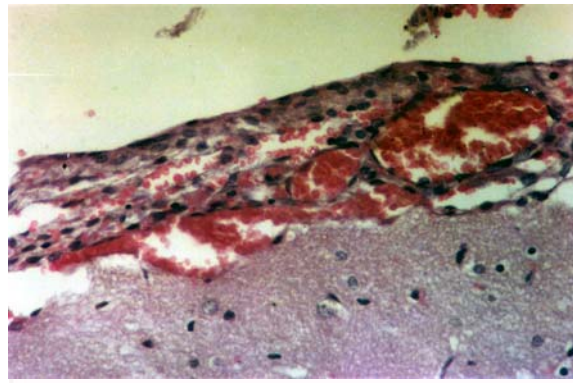


Рис. 1. Мозок щура 10-ї доби після ЧМТ. Розпушення, розшарування м'яких мозкових оболонок, субарахноїдальний крововилив. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 200$ .

По ходу м'яких оболонок головного мозку виявляли субарахноїдальні крововиливи, які проникали в передню міжпівкулеву щілину, а також поширювались по ходу борозен і звивин. Подекуди скупчення крові розташовувались у поверхневих відділах кори та прилеглої білої речовини мозку, утворюючи невеликі вогнища геморагічного інфарктування, частіше клиноподібної форми чи більш протяжні площинні – в межах кори мозку (рис. 2). Більші зливні осередки геморагічного просочування його тканини спостерігали подекуди на основі мозку.

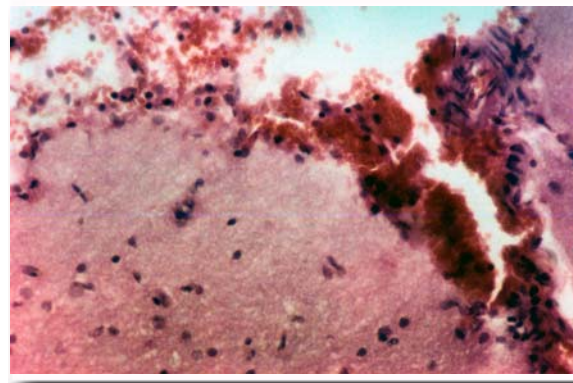


Рис. 2. Субарахноїдальний крововилив з геморагічним інфарктуванням поверхневих відділів мозку. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 200$ .

Характерною для таких осередків повної чи часткової деструкції речовини мозку була наявність перифокальної зони некробіотичних змін нервових клітин, у якій відзначали появу осередків спустошення внаслідок загибелі частини нейронів. Для нейронів, що збереглися, характерними були деформація й зморщування цитоплазматичних тіл, зменшення їхнього об'єму, патологічна (штопороподібна) звивистість відростків, ознаки каріопікнозу й хроматолізу субста-



нції Нісля, гомогенізація цитоплазми в деяких нейронах з інтенсифікацією їхнього забарвлення внаслідок збільшення проникності клітинних мембран. Серед таких патологічно змінених нейронів часто виявляли тіні загиблих клітин (рис. 3).

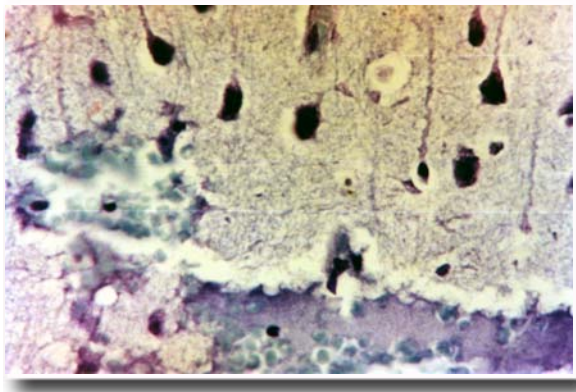


Рис. 3. Мозок щура після ЧМТ. Мозкова речовина навколо крововиливу. Різні ступені дистрофічних і некробіотичних змін нервових клітин. Забарвлення тіоніном.  $\times 800$

Навколо осередків травматичного пошкодження в суміжних та віддалених ділянках речовини мозку повсякчас знаходили щілиноподібні розширення периваскулярних і перинейрональних просторів, що свідчило про наявність дифузного набряку тканини мозку. Ознаки гідропічного набухання виявляли також у цитоплазмі астроцитів і олігодендроцитів, мієлінових волокон білої речовини мозку (рис. 4).

Окрім осередкових крововиливів у корі мозку виявлено також дрібні крововиливи діapedезного характеру в білій речовині мозку, а також у перивентрикулярних відділах бокових шлуночків. У просвіті останніх також виявляли скупчення еритроцитів.

Крім того, на всьому протязі тканини головного мозку тварин групи Контроль-2 (ЧМТ без лікування) відмічено ознаки дистонічного розширення судин мікроциркуляторного русла з переповненням їх елементами крові й стазом.

Оцінка цитоархітекtonіки гіпокампа на серії зрізів мозку тварин цієї групи показала, що в усіх його зонах наявні нейрони з деформованою цитоплазмою й пікнотичними гіперхромними ядрами. Дистрофічні зміни були по-особливому виражені в більшості нейронів С3 – поля гіпокампа у вигляді гомогенізації й зморщування цитоплазми, редукції відростків і гіпохромії ядер з крайовою конденсацією хроматину (рис. 5). Поява патологічно змінених клітин зумовлювала дезорганізацію архітекtonіки гіпокампа щурів, що зазнали тяжкої ЧМТ.

При морфологічному дослідженні тканини мозку тварин, що отримували лікування, – ліпосомальну трансфекцію тканини головного мозку

плазмідним вектором з геном апоE2 (група Дослід), – на 10-у добу після травми, у порівнянні з групою Контроль-2, структурні зміни були значно менш вираженими. М'які мозкові оболонки головного мозку зберігали звичайну структуру на більшому протязі його конвексимальної поверхні й основи. Лише подекуди відмічено їхнє незначне відшарування з невеликою кількістю еритроцитів. Субарахноїдальні простори були вільними від формених елементів крові й тільки де-не-де містили невелику кількість незмінених еритроцитів.

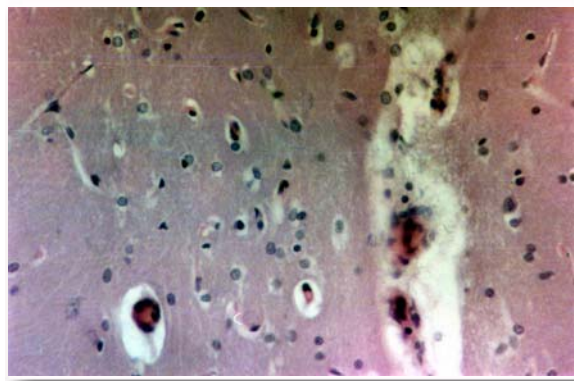


Рис. 4. Ознаки периваскулярного й перичелюлярного набряку в білій речовині мозку щура після ЧМТ. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 200$ .

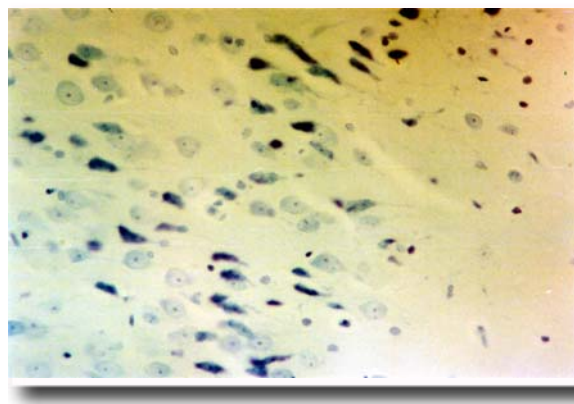


Рис. 5. Дистрофічні зміни в пірамідних клітинах зони С3 гіпокампа щура після ЧМТ. Забарвлення тіоніном.  $\times 400$ .

Такий само незначний за об'ємом вміст еритроцитів осередково простежували й по ходу м'яких мозкових оболонок міжпівкулевої щілини. У речовині мозку на всьому протязі судини капілярного типу мали звичайний просвіт, подекуди були незначно розширеними. Довкола окремих із них зрідка відзначались невеликі групи еритроцитів. Лише подекуди в окремих ділянках переважно базальних відділів мозку виявляли невеликі осередки периваскулярних крововиливів (рис. 6).

Для загальної мікроструктури кори й речо-

вини мозку в цілому, включаючи стінки шлуночків, характерним було збереження їхньої архітекτονіки. У тканині мозку щурів, яким виконувалась генна терапія (група Дослід), не відзначали осередків деструкції й геморагічного інфарктування (рис. 7). Лише подекуди виявляли невеликі остаточні зони геморагічного розм'якшення речовини мозку, навколо яких цитоструктура більшості нейронів була збережена. В окремих з них відмічено гіпохромію ядер і гомогенізацію речовини цитоплазми, що відображало зворотні дистрофічні зміни.

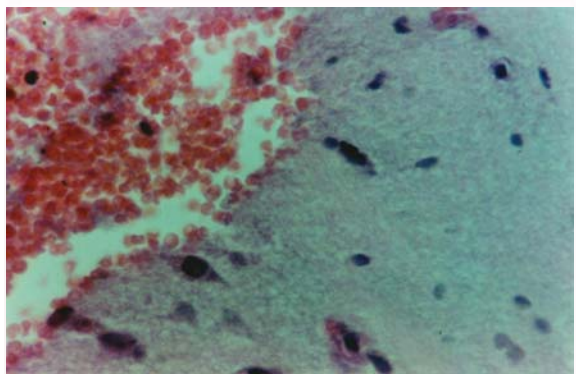


Рис. 6. Осередок крововиливу в ділянці основи мозку щура з ЧМТ після ліпосомальної трансфекції з трансфером гена апоЕ2. Збереження архітекτονіки речовини мозку, прилеглої до ділянки крововиливу. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 400$ .

Оцінка морфологічних ознак набряку-набухання в тканині мозку тварин групи Дослід, у порівнянні з групою Контроль-2 (ЧМТ без лікування), виявила значно меншу за виразністю та непостійну наявність розширення периваскулярних і перичелюлярних просторів. При цьому ознаки гідропічного набухання мієліну нервових волокон у білій речовині були відсутні. Це свідчить про меншу виразність і поширеність реактивного набряку-набухання речовини головного мозку дослідних тварин.

Гістологічне дослідження гіпокампу в тварин групи Дослід (ЧМТ + ліпосомальна трансфекція тканини головного мозку плазмідним вектором з геном апоЕ2) виявило майже повне відновлення структури більшості пірамідних нейронів, які до досліджуваного терміну набували характерної морфології, близької до нормальної.

Проведені дослідження показали, що застосування в експериментальних тварин з тяжкою закритою дифузною ЧМТ генної терапії, яка забезпечує індукцію синтезу в травмованій ЦНС ізоформи  $\epsilon 2$  АпоЕ людини в ранні терміни після травми, справляє протекторний вплив на судинну систему й паренхіму мозку, попереджаючи утворення зон вторинної дезінтеграції в травмованому мозку. Про це свідчить значне зменшення (до слідів) виразності ознак порушення про-

никності капілярів і пошкодження клітин паренхіми мозку, реактивного набряку мозку тварин. Одержані результати відображають реалізацію вираженого протекторного ефекту генної терапії в щурів з ЧМТ.

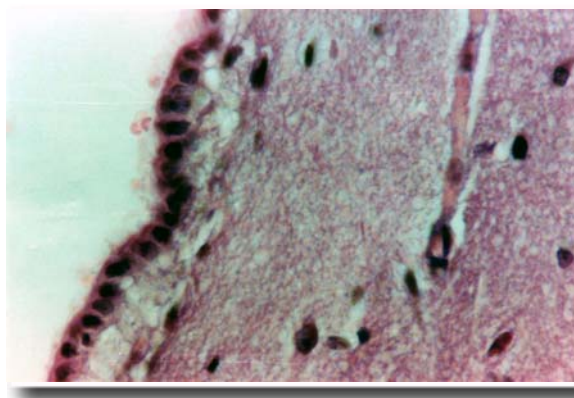


Рис. 7. Цілість структури стінки бокового шлуночка в мозку щура з ЧМТ після ліпосомальної трансфекції з трансфером гена апоЕ2. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 400$ .

Оцінка ефективності використаного методу генної терапії основана на аналізі результатів дослідження часового й просторового профілю морфологічних змін у головному мозку у відповідь на експериментальну ЧМТ. Кров, що вилілася за межі судинного русла, упродовж гострого періоду травми обумовлює виникнення в перифокальній нервовій тканині, що є прилеглою до осередків крововиливу, запально-некротичних змін, які завершуються гліозом і формуванням кістозних порожнин (Levin H.S., 1996).

Окрім цього, не тільки при дифузному, але й при строго локальному пошкодженні кори через деякий час після ЧМТ спостерігають загибель нейронів на значній відстані від місця первинної травми. Дослідження останнього десятиріччя показали, що вторинне пошкодження нейронів обумовлене некрозом та апоптозом цих клітин. Останній є морфологічним проявом процесу програмованої клітинної смерті, активного процесу загибелі клітин, у якому клітина самостійно бере участь у власній смерті (Clark R.S. et al., 1997; Yacovlev A.G. et al., 1997; Conti A.C. et al., 1998; Kaya S.S. et al., 1999; Pohl D. et al., 1999; Runnerstam M. et al., 2001; Yang X.Y. et al., 2001).

Разом з тим, тривалий перебіг вторинної загибелі нервових клітин (упродовж годин, днів і навіть місяців після травми) визначає існування так званого «терапевтичного вікна», що дозволяє вживати терапевтичних заходів, які сприяють забезпеченню нейропротекції (Saatman K.E. et al., 1996; Johnston M.V. et al., 2000).

Зручним об'єктом для вивчення вибірково вразливих відділів мозку при ЧМТ є гіпокамп, в якому зменшення після травми кількості нейро-

цитів є чітким критерієм тяжкості ЧМТ як в експериментальних тварин, так і в людини. У свою чергу, методи лікування направлені на зменшення загибелі нейронів гіпокампу, поліпшують функціональні наслідки травми як в експерименті, так і в клініці. У ряді робіт показано ефективність гістологічного дослідження гіпокампу в оцінці впливу різноманітних методів медикаментозної й клітинної терапії при експериментальній ЧМТ (Kotarka M.J. et al., 1994; Jenkins L.W. et al., 1999; Pohl D. et al., 1999; Kim B.-T. et al., 2001; Philips M.F. et al., 2001; Chen X. et al., 2009; Doll H. et al., 2009; Jia F. et al., 2009).

У нашому експерименті індукція синтезу в нервовій тканині ізоформи  $\epsilon 2$  АпоЕ людини сприяла попередженню вторинного пошкодження мозку, регресу структурних проявів експериментальної ЧМТ у щурів, а також підвищенню виживаності нейронів гіпокампу.

Результати наших досліджень показують, що генна терапія, направлена на запуск синтезу в клітинах ЦНС ізоформ АпоЕ людини при експериментальній ЧМТ у щурів, здатна попереджати прогресування й поглиблення пошкодження мозку, забезпечуючи регрес як структурних змін, так і обумовлених ними функціональних порушень, а саме дефіциту просторової пам'яті й здатності до навчання (Белошицкий В.В. и соавт., 2009а, 2009б).

#### Висновки

1. Тяжка дифузна ЧМТ у щурів, відтворена за допомогою «моделі ударного прискорення», на 10-у добу після травми характеризується формуванням виразних структурних змін паренхіми й судинної системи головного мозку. Характер-

ними для них є наявність фрагментарного відшарування м'яких оболонок головного мозку, їхнє набухання й розшарування дифузно-вогнищевими, нерідко масивними скупченнями змінених еритроцитів; інфарктування прилеглих до крововиливів ділянок мозкової речовини з формуванням перифокальних зон некробіотичних змін нервових клітин; наявність дифузного набряку тканини головного мозку; порушення цитоархітектоники гіпокампу з формуванням виразних дистрофічних змін його нейронів.

2. Ліпосомальна трансфекція клітин ЦНС плазмідним вектором, що несе ген ізоформи  $\epsilon 2$  апоЕ людини, забезпечує протекторний вплив на судинну систему й паренхіму головного мозку, гальмуючи розвиток його вторинних уражень при експериментальній ЧМТ у щурів. Про це свідчить зменшення виразності ознак порушення проникності капілярів і пошкодження паренхіми мозку, реактивного набряку головного мозку пролікованих тварин за даними гістологічного дослідження.

3. Генна терапія є перспективним методом лікування ЧМТ в експерименті, що справляє позитивний вплив на процеси репарації в нервовій тканині.

#### Перспективи подальших розробок

З урахуванням наведених відомостей літератури наші результати продемонстрували ефективність цього методу лікування ЧМТ і підтвердили перспективність застосування генної терапії при травматичному ушкодженні головного мозку, а також показали необхідність проведення подальших досліджень у цій галузі.

#### Літературні джерела

Влияние генной терапии на структурные проявления черепно-мозговой травмы в эксперименте / В. В. Белошицкий, В. М. Семенова, Н. Я. Гридина [и др.] // Укр. нейрохірург. журнал. – 2009. – № 1. – С. 14-20.

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. журнал. – 2009. – № 2. – С. 59-63.

Педаченко Е. Г. Аполипопротеин Е: физиологическая роль и возможная терапевтическая эффективность при черепно-мозговой травме / Е. Г. Педаченко, В. В. Белошицкий, И. Г. Васильева // Нейрохірургия. – 2003. – № 1. – С. 59-65.

Педаченко Є. Г. Стан і перспективи організаційного вдосконалення в Україні спеціалізованої допомоги при черепно-мозковій травмі / Є. Г. Педаченко, А. М. Морозов // Перший з'їзд нейрохірургів України: тези доп. - К., 1993. - С. 10.

Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury / A. G. Yakovlev, S. M. Knoblach, L. Fan [et al.] // J. Neurosci. - 1997. - Vol. 17, № 19. - P. 7415-7424.

A new model for diffuse brain injury by rotational acceleration: II. Effects on extracellular glutamate, intracranial pressure, and neuronal apoptosis / M. Runnerstam, F. Bao, Y. Huang [et al.] // J. Neurotrauma. - 2001. - Vol. 18, № 3. - P. 259-273.

A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics / A. Marmarou, M. A. Foda, W. van den Brink [et al.] // J. Neurosurg. - 1994. - Vol. 80. - P. 291-300.

Apolipoprotein E affects the central nervous system response to injury and the development of cerebral edema / J. R. Lynch, J. A. Pineda, D. Morgan [et al.] // Ann. Neurol. - 2002. - Vol. 51, № 1. - P. 113-117.

Apoptosis and expression of p53 response proteins and cyclin D1 after cortical impact in rat brain /



S. S. Kaya, A. Mahmood, Y. Li [et al.] // Brain. Res. - 1999. - Vol. 818, № 1. - P. 23-33.

Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats / R. S. Clark, J. Chen, S. C. Watkins [et al.] // J. Neurosci. - 1997. - Vol. 17, № 23. - P. 9172-9182.

Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat / K. E. Saatman, H. Murai, R. T. Barbus [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1996. - Vol. 93, № 10. - P. 3428-3433.

Combined therapy affects outcomes differentially after mild traumatic brain injury and secondary forebrain ischemia in rats / L. W. Jenkins, Y.-C. Lu, W. E. Johnston [et al.] // Brain Res. - 1999. - Vol. 817. - P. 132-144.

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. - Vol. 26. - P. 243-252.

Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period / A. C. Conti, R. Raghupathi, J. Q. Trojanowski, T. K. McIntosh // J. Neurosci. - 1998. - Vol. 18, № 15. - P. 5663-5672.

Experimental study on expression and activation of caspase-3 after acute brain trauma / X. Y. Yang, S. Y. Yang, J. N. Zhang, L. Xue // Proceedings of the 12<sup>th</sup> World Congress of Neurosurgery. - Sydney, 2001. - P. 155-157.

Glucocorticoids aggravate retrograde memory deficiency associated with traumatic brain injury in rats / X. Chen, K.-L. Zhang, S.-Y. Yang [et al.] // J. Neurotrauma. - 2009. - Vol. 26. - P. 253-260.

Hippocampal pathology in fatal human head injury without high intracranial pressure / M. J. Kotapka, D. I. Graham, J. H. Adams [et al.] // J. Neurotrauma. - 1994. - Vol. 11. - P. 317-324.

Levin H. S. Neurobehavioral outcome of closed

head injury: implications for clinical trials // Traumatic brain injury: bioscience and mechanics / Eds. F. A. Bandak, R. H. Eppinger, A. K. Ommaya. - Larchmont, N.Y. : Mary Ann Liebert, 1996. - P.105.

Motor and cognitive deficits in apolipoprotein E-deficient mice after closed head injury / Y. Chen, L. Lomnitski, D. M. Michaelson, E. Shohami // Neuroscience. - 1997. - Vol. 80, № 4. - P. 1255-1262.

Neuroprotective and behavioral efficacy of nerve growth factor – transfected hippocampal progenitor cell transplants after experimental traumatic brain injury / M. F. Philips, G. Mattiasson, T. Wieloch [et al.] // J. Neurosurg. - 2001. - Vol. 94, № 5. - P. 765-774.

N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain / D. Pohl, P. Bittigau, M. J. Ishimaru [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1999. - Vol. 96, № 5. - P. 2508-2513.

Novel treatments after experimental brain injury / M. V. Johnston, W. H. Trescher, A. Ishida [et al.] // Semin. Neonatol. - 2000. - Vol. 5, № 1. - P. 75-86.

Pharyngeal selective brain cooling improves neurofunctional and neurocognitive outcome after fluid percussion brain injury in rats / H. Doll, H. Truebel, F. Kipfmüller [et al.] // J. Neurotrauma. - 2009. - Vol. 26. - P. 235-242.

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. - Vol. 95, № 4. - P. 674-679.

Sinson G. Combined fetal neural transplantation and nerve growth factor infusion: effects on neurological outcome following fluid-percussion brain injury in the rat / G. Sinson, M. Voddi, T. K. McIntosh // Neurosurg. Focus. - 1999. - Vol. 7, № 3. - P. 245-251.

**Педаченко Е.Г., Белошицкий В.В., Семенова В.М., Гридина Н.Я., Цыба Л.А. Влияние липосомальной трансфекции плазмидным вектором с геном апоЕ2 на структурные изменения головного мозга при экспериментальной черепно-мозговой травме.**

**Резюме.** Изучена возможность предупреждения развития структурных изменений головного мозга, обусловленных его вторичными повреждениями при черепно-мозговой травме, с помощью генной терапии, направленной на индукцию синтеза в нервной ткани изоформы  $\epsilon 2$  АпоЕ. Тяжелую черепно-мозговую травму наносили крысам под общей анестезией путем свободного падения груза массой 450 г с высоты 1,5 м. Внутривентрикулярную инфузию катионных липосом DOTAP, несущих 25 мкг плазмидного вектора pCMV•SPORT6 с кДНК гена апоЕ2, выполняли с помощью осмотических помп ALZET. Гистологическое исследование головного мозга выполняли на 10-е сут после травмы. Липосомальная трансфекция ткани мозга крыс плазмидным вектором с геном апоЕ2 обеспечивала протекторное действие на сосудистую систему и паренхиму мозга, предотвращала формирование зон вторичной дезинтеграции в травмированном мозге. Об этом свидетельствовало значительное уменьшение (до следовой) выраженности признаков нарушения проницаемости капилляров и повреждения паренхимы мозга, реактивного отека мозга леченых животных.

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма, генная терапия, апоЕ2, плазмидный вектор, катионные липосомы.