



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102843** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61K 48/00
A61B 17/00
G09B 23/28 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 04143	(72) Винахідник(и): Михальський Сергій Анатолійович (UA), Білошицький Вадим Васильович (UA), Квітницька-Рижова Тетяна Юріївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 28.04.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.11.2015	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ ІМ. Д.Ф. ЧЕБОТАРЬОВА НАМН УКРАЇНИ", вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 04114 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2015, Бюл.№ 22	

(54) СПОСІБ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВОЇ ТРАВМИ ТА ОЦІНКИ ЇЇ ЕФЕКТИВНОСТІ У ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ

(57) Реферат:

Спосіб генної терапії експериментальної черепно-мозкової травми та оцінки її ефективності у тварин різного віку є експериментальним методом лікування, при якому здійснюють оцінку кількості та стану клітин (з урахуванням їхнього стану) у корі та гіпокампі головного мозку щурів на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях з визначенням апоптотичного індексу після черепно-мозкової травми (ЧМТ) і генної терапії (ГТ) плазмідною, що несе ген AроЕ3 людини для кількісної оцінки змін у еволюційно різних структурах мозку при ЧМТ та ГТ у тварин різного віку. Проводять підрахунок кількості нейронів (незмінних, гіперхромних та вакуолізованих), гліоцитів та мікрогліоцитів на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях у корі та гіпокампі мозку дорослих і старих щурів після черепно-мозкової травми (ЧМТ) і генної терапії (ГТ). TUNEL-методом визначають клітини, що вступили в апоптоз, обчислюють апоптотичний індекс, за допомогою конфокальної мікроскопії оцінюють зміни взаємодії між нейронами та астроцитами, оцінюють зміни розмірів та особливості галуження відростків гліальних клітин.

UA 102843 U

Корисна модель належить до медицини, а саме нейрохірургії, і може бути застосована для лікування експериментальної черепно-мозкової травми та оцінки її ефективності у тварин різного віку.

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) може стати причиною серйозних патологічних змін і когнітивних розладів у людей різних вікових груп. При старінні погіршується здатність нервової тканини до відновлення після ЧМТ, що може призводити до тяжких наслідків та провокувати нейродегенеративні захворювання. В останні роки спостерігається зростання інтересу до геннотерапевтичних підходів і техніки їх застосування при ЧМТ і віковій патології ЦНС. Введення алеля $\epsilon 3$ аполіпопротеїну Е (АроЕ3) у мозок може сприяти як покращенню лікування наслідків ЧМТ, так і запобігати розвитку такої вік-залежної патології, як хвороба Альцгеймера. Мета роботи - дослідження структурних і ультраструктурних особливостей та апоптотичних змін сенсомоторної кори та гіпокампа дорослих (8 міс.) та старих (24 міс.) щурів-самців Wistar після ЧМТ та подальшої генної терапії (ГТ). Методи. Моделювання ЧМТ за моделлю "ударного прискорення"; ГТ шляхом введення катіонних ліпосом DOTAP, що містили плазмідний вектор з геном АроЕ3 людини; забій щурів проводили через 10 діб після ЧМТ та ГТ; світлова, конфокальна та електронна мікроскопія; дослідження цитоархітекτονіки кори та гіпокампа при фарбуванні за Ніслем; аналіз взаємодії нейронів та астроцитів після подвійного імунічення за маркером нейронів NeuN та астроцитів GFAP, виявлення апоптозу TUNEL-методом; морфометрія.

Найбільш близьким найближчим аналогом запропонованого методу є класичний спосіб медикаментозної терапії черепно-мозкової травми [1, 2]. Цей метод дозволяє проводити патогенетичне лікування ЧМТ, але у деяких випадках не достатньо ефективне.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення більш ефективного способу генної терапії експериментальної черепно-мозкової травми та оцінки її ефективності у тварин різного віку.

Поставлена задача вирішується тим, що пропонується оцінка кількості клітин (з урахуванням їхнього стану) у корі та гіпокампі головного мозку щурів на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях з визначенням апоптотичного індексу після черепно-мозкової травми і генної терапії плазмідною, що несе ген АроЕ3 людини для кількісної оцінки змін у еволюційно різних структурах мозку при ЧМТ та ГТ у тварин різного віку, а саме проводиться підрахунок кількості нейронів (незмінних, гіперхромних та вакуолізованих), гліоцитів та мікрогліоцитів на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях у корі та гіпокампі мозку дорослих і старих щурів після ЧМТ і ГТ, TUNEL-методом визначаються клітини, що вступили в апоптоз, обчислюється апоптотичний індекс, за допомогою конфокальної мікроскопії оцінюються зміни взаємодії між нейронами та астроцитами, оцінюються зміни розмірів та особливості галузження відростків гліальних клітин, таким чином робиться кількісна оцінка змін у еволюційно різних структурах мозку при ЧМТ та ГТ у тварин різного віку.

Запропонований нами спосіб виконується наступним чином.

кДНК гена АроЕ3 клонують у плазмідний вектор, який має цитомегаловірусний промотор та сигнал поліаденілування SV40, що дозволяє експресувати клоновані в ньому послідовності в еукаріотичних клітинах. Препарат катіонних ліпосом та плазмідної ДНК готується за 15 хвилин до внутрішньошлуночкової інфузії шляхом змішування їх водних розчинів при кімнатній температурі. Використовується препарат катіонних ліпідів DOT AP Methosulfate. Співвідношення ліпіди/ ДНК, яке забезпечує найбільш ефективну трансфекцію, при застосуванні цього препарату складає 5:1. Для доставки препарату в головний мозок щурів після задання їм ЧМТ використовуються осмотичні помпи ALZET, які заповнюються препаратом катіонних ліпосом, що містить плазмідний вектор з геном АроЕ3, безпосередньо перед установкою канюлі від помпи в боковий шлуночок. Застосовується модель помпи 200 ID, яка забезпечує безперервну інфузію зі швидкістю 8 мкл/год. упродовж 25 годин. Усього в боковий шлуночок мозку вводиться 25 мкг плазмідної ДНК.

Усі хірургічні процедури виконуються під загальною анестезією. Голову тварини фіксують у стереотоксичному апараті. Виконується поздовжній розріз скальпа завдовжки 2 см з відкриттям bregma (точки перетину коронарного й сагітального швів черепа) та lambda (точки перетину сагітального й лямбдоподібного швів), або використовується розріз, виконаний при моделюванні ЧМТ. У підшкірному просторі спини щура, починаючи від нижнього краю розрізу, і далі через міжлопатковий простір, корнцангом формується кишень для осмотичної помпи. У точці проекції переднього рога бокового шлуночка за допомогою бормашини круглою фрезою на кістку склепіння черепа накладається фрезований отвір. Використовуються такі стереотаксичні координати переднього рога бокового шлуночка: позаду від bregma-0,8 мм, латерально - 1,5 мм, дорзовентрально - 4,8 мм. Канюля завдовжки 5 мм встановлюється через фрезований отвір і

фіксується до поверхні черепа зубним цементом. Осмотична помпа занурюється в підшкірну кишеню. Рана зашивається атравматичним швом.

Пропонований спосіб застосовано в дослідженні з оцінки ефективності генної терапії при експериментальній ЧМТ в щурів. ЧМТ моделювалась падінням вантажу вагою 450 г з висоти 1,5 м (тяжка ЧМТ). Відразу після травми у боковий шлуночок головного мозку щурів основної групи виконувалась інфузія катіонних ліпосом, що містили плазмідний вектор pCMV-SPORT6, у який під контроль цитомегаловірусного промотору вбудовувалась кДНК гену AroE3 (5 тварин). Контролем слугували інтактні щури (5 дорослих і 4 старих тварини) та тварини, яким виконувались усі хірургічні процедури крім інфузії препарату, що досліджувався (5 тварин). Через 10 днів після ЧМТ щурів умертвляли. Мозок щурів вилучали для світлової та електронної мікроскопії, морфометрії (підррахунку кількості нейронів з урахуванням їхнього якісного складу, а також макро- й мікроглії на одиницю довжини гіпокампа - лінійної щільності (ЛЩ) нейронів і гліоцитів) та на одиницю площі кори головного мозку. Ефективність трансфекції в зразках тканини мозку підтверджувалась за допомогою методу RT-PCR. За даними RT-PCR, передбачувані продукти ПЦР розмірами 180 та 295 пар основ було виявлено в усіх зразках мозкової тканини щурів, які зазнали трансфекції геном AroE3.

Результати. 1) На світлооптичному рівні після забарвленням за Нісслем визначалася кількість нейронів та гліоцитів у сенсомоторній корі та CA1-зоні гіпокампа. 2) При підррахунках враховували форму і стан клітин. 3) Кількісно оцінювали рівень апоптозу, визначаючи відношення (частку) апоптотичний ядер клітин, що визначалися за TUNEL-методом, до загальної кількості ядер. 4) Всі підррахунки виконувались у експериментальних групах дорослих і старих тварин. За таким підходом визначено, що після ЧМТ змінювалася форма нейронів та астроцитів, зростала частка гіперхромних нейронів. Астроцити змінювали свою форму із зірчастої на куцисту. У корі спостерігалася втрата нейронів: їх кількість у дорослих зменшувалася на 5-8 %, а у старих - у 2,4 разу порівняно з контрольною групою. Значно більші втрати були у IV-VI шарах кори, ніж у I-III, що узгоджується також зі збільшенням апоптотичного індексу. Кількість гліоцитів (Гл) зросла у 3 рази як у 8-, так і у 24-місячних щурів. Кількість ендотеліоцитів (ЕК) зростала в 2,4 разу у дорослих та в 1,6 разу у старих. Кількість апоптотичних клітин на 10 добу після ЧМТ була незначною, змінюючись не суттєво в порівнянні з контролем, проте була дещо більшою у дорослих, ніж у старих щурів. ГТ сприяла зниженню нейронних втрат на 4-8 % у дорослих та в 2 рази у старих, зменшенню кількості Гл у 3,2 разу у дорослих і в 1,6 разу у старих та суттєво не вплинула на кількість ЕК. Кількість та розподіл апоптотичних клітин (переважно поодиноких) на 10 добу після ЧМТ і ГТ суттєво не змінилися в порівнянні з групою ЧМТ. Оскільки нейронні втрати у старих тварин були значно більшими, ніж у дорослих, можна припустити, що завершення апоптозу у сенсомоторній корі старих щурів відбувається швидше, ніж у дорослих. Отже, зменшення реактивного гліозу та нейронних втрат у сенсомоторній корі дорослих та старих щурів, що отримували ГТ після ЧМТ, свідчить про значний відновлювальний ефект ГТ ліпосомами з плазмідною, що несе ген AroE3 людини. Проводилося також порівняння змін кількості нейронів у корі та гіпокампі щурів різного віку після ЧМТ. Виявлено, що після ЧМТ кількість нейронів у корі дорослих тварин зменшується на 30 %, а у гіпокампі - на 20 %, а у старих тварин ситуація інша - травма викликає зменшення кількості нейронів у корі на 13 %, а у гіпокампі - на 32 %. Тобто, гіпокамп, як еволюційно більш старе утворення, виявилось у дорослих більш стійким до дії ЧМТ. Крім того, гіпокамп менше втрачає нейронів при старінні, проте, адаптаційні можливості його нейронів, що залишаються у старих тварин знижуються, що і проявляється в умовах дії такого надсильного стресу як травма. І в корі, і в гіпокампі старих щурів після ЧМТ кількість нейронів, наближається до однакової критичної точки - 67 % від їх (початкової) кількості у нормально сформованій структурі (у дорослих). Генна терапія ліпосомами з AroE3-плазмідною запобігає втраті нейронів і у корі, і в гіпокампі і її лікувальний вплив на параметр відновлення кількості нейронів (майже до контрольних значень відповідного віку) більш виражений у старих тварин. ГТ є перспективним методом лікування ЧМТ, що справляє позитивний вплив на процеси репарації в нервовій тканині та сприяє виживанню старих тварин.

Спосіб впроваджений на базі лабораторії морфології та цитології ДУ "Інститут геронтології ім Д.Ф. Чеботарьова НАМН України" та лабораторії експериментальної нейрохірургії ДУ "Інститут нейрохірургії ім А.П. Ромоданова НАМН України" та є досить ефективним. Загальна смертність за період проведення експериментального дослідження не перевищувала 20 %.

В порівнянні із найближчим аналогом, запропонований спосіб має ряд переваг: забезпечує більш виражений терапевтичний ефект; дозволяє проводити більш точну діагностику ЧМТ у тварин; дозволяє проводити більш якісну оцінку ефективності лікування ЧМТ; врахувати вікові відмінності ефективності терапії ЧМТ.

Джерела інформації:

1. Педаченко Е.Г., Белошицкий В.В., Васильева И.Г. Аполипопротеин Е: физиологическая роль и возможная терапевтическая эффективность при черепно-мозговой травме // Нейрохирургия. - 2003. - № 1. - С. 59-65.
- 5 2. Педаченко Е.Г., Белошицкий В. В., Михальський С. А., Гридіна Н.Я., Квітницька-Рижова Т. Ю. Возможности генной терапии повреждений головного мозга и функционального дефицита при черепно-мозговой травме у шурів різного віку // Журнал НАМН України. - 2012. - Т. 18, № 2. - С. 171-185.
- 10 3. Marmarou AL, Foda M.A., van den Brink W., Campbell J., Kita H., Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics // J Neurosurg.-1994.- Vol.80, N2.- P. •291-300.
4. Laskowitz D.T., Vitek M.P. Apolipoprotein E and neurological disease: therapeutic potential and pharmacogenomic interactions // Pharmacogenomics.-2007.- V.8, №8. - P. 959-969.
- 15 5. Narayan R. K., Michel M. E., Ansell B. et al. Clinical trials in head injury // Experimental & Translational Stroke Medicine. - 2002. - Vol. 19, N 5. - P. 503-557.
6. Sahuquillo J., Poca M.A., Amoros S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury // Curr. Pharm. Des. - 2001. - V.7, № 15. - P. 1475-1503.
7. Shen F., Wen L., Yang X., Liu W. The potential application of gene therapy in the treatment of traumatic brain injury // Neurosurg. Rev. - 2007. - V.30. - P. 291-298.
- 20 8. Zou L.L., Huang L., Hayes R.L. et al. Liposome-mediated NGF gene transfection following neuronal injury: potential therapeutic applications // Gene Ther.-1999. - V.6. - P. 994-1005.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 25 Спосіб генної терапії експериментальної черепно-мозкової травми та оцінки її ефективності у тварин різного віку, що є експериментальним методом лікування, який **відрізняється** тим, що здійснюють оцінку кількості та стану клітин (з урахуванням їхнього стану) у корі та гіпокампі головного мозку шурів на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях з визначенням апоптотичного індексу після черепно-мозкової травми (ЧМТ) і генної терапії (ГТ) плазмідом, що
- 30 несе ген АроЕ3 людини для кількісної оцінки змін у еволюційно різних структурах мозку при ЧМТ та ГТ у тварин різного віку, а саме проводять підрахунок кількості нейронів (незмінних, гіперхромних та вакуолізованих), гліоцитів та мікрогліоцитів на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях у корі та гіпокампі мозку дорослих і старих шурів після черепно-мозкової травми (ЧМТ) і генної терапії (ГТ), TUNEL-методом визначають клітини, що
- 35 вступили в апоптоз, обчислюють апоптотичний індекс, за допомогою конфокальної мікроскопії оцінюють зміни взаємодії між нейронами та астроцитами, оцінюють зміни розмірів та особливості галуження відростків гліальних клітин, таким чином здійснюючи кількісну оцінку змін у еволюційно різних структурах мозку при ЧМТ та ГТ у тварин різного віку.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601