

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

Білошицький В.В.

Лікувальний вплив ізоформи ε3 аполіпопротеїну Е на патофізіологічні механізми вторинного ураження головного мозку при експериментальній черепно-мозковій травмі

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, відділення нейротравми, м. Київ

Мета. Вивчити терапевтичні можливості застосування ізоформи ε3 аполіпопротеїну Е, синтез якої в нервовій тканині індукований методом генної терапії, при експериментальній черепно-мозковій травмі (ЧМТ) і на підставі аналізу даних літератури пояснити можливі механізми його лікувальної дії.

Методи. Структурні та функціональні зміни оцінювали у дорослих щурів-самців лінії Вістар на 10-ту добу після тяжкої дифузної ЧМТ, відтвореної на моделі «ударного прискорення» падаючим вантажем. Після ЧМТ комплекс катіонних ліпосом ДОТАП і 25 мкг плазмідного вектора рСМV-АРОЕ3 вводили в шлуночок мозку за допомогою осмотичних pomp ALZET. Оцінювали СА1 поля гіпокампа за допомогою світлової та електронної мікроскопії, морфометрії, імуноцитохімічного і конфокально-мікроскопічного дослідження з використанням селективних маркерів нейронів (NeuN) і астроцитів (GFAP). Функціональний результат травми оцінювали в тесті «відкрите поле».

Результати. За даними експериментального дослідження, ліпосомальна трансфекція геном апоЕ3 надає позитивний лікувальний ефект на структуру і ультраструктуру гіпокампа, зменшує загибель нейронів, ступінь дифузного ушкодження аксонів, гліоз і мікрогліальну реакцію, а також сприяє регресу посттравматичного стресу і тривожності.

Висновок. За даними літератури, можливими механізмами лікувальної дії АпоЕ3 є вплив аполіпопротеїну Е на нормалізацію ліпідного компонента нервових клітин, роль аполіпопротеїну Е в регуляції гліальних реакцій і запальної відповіді ЦНС на травму, антиоксидантні ефекти аполіпопротеїну Е, участь аполіпопротеїну Е в регуляції процесів смерті клітин, вплив аполіпопротеїну Е на експресію інших генів і регуляція геномної відповіді клітин ЦНС на травму.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, генна терапія, аполіпопротеїн Е, ізоформа ε3, механізм лікувальної дії.

Вступ. Черепно-мозкова травма (ЧМТ) є основною причиною смерті та інвалідизації потерпілих молодого віку як у розвинутих країнах, так і в тих, що розвиваються [1]. За даними сучасних епідеміологічних досліджень, щороку в світі ЧМТ виникає майже у 10 млн. потерпілих [2]. Летальність за тяжких форм ЧМТ становить 35–40% [1], ознаки стійких наслідків черепно-мозкового ушкодження, включаючи неврологічні, когнітивні, психічні та психіатричні розлади, тільки в США виявляють майже у 2% населення [3].

Наведена статистика підкреслює нагальну потребу у застосуванні ефективних методів лікування, які могли би суттєво знизити летальність та зменшити вираженість наслідків травми у потерпілих. Незважаючи на досягнення фундаментальних і клінічних досліджень, а також успіхи в розвитку інтенсивної терапії в останні роки, доводиться констатувати відсутність специфічної фармакотерапії ЧМТ, яка відповідає б таким вимогам. Виправити ситуацію може розуміння клітинних та молекулярних механізмів, що є підґрунтям патофізіологічних процесів, які відбуваються після ЧМТ, і розробка лікувальних засобів з відповідними мішенями терапевтичного впливу [1].

Мета роботи: вивчити терапевтичні можливості ізоформи ε3 аполіпопротеїну Е (АпоЕ — білок; апоЕ — ген), синтез якої у нервовій тканині індукований методом генної терапії, при експериментальній ЧМТ і на підставі даних літератури пояснити можливі механізми її лікувальної дії.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведено на дорослих (6–8 міс) щурах-самцях лінії Wistar, масою тіла — 350–400 г, розведення віварію Інституту нейрохірургії, які розподілені на 4 групи.

– *Контроль* — група інтактних тварин (5 щурів).

– *Пл* — в лівій бічній шлуночок мозку тваринам встановлювали канюлю, яку з'єднували з встановленим під шкіру спини резервуаром (осмотичною помпою), що забезпечував інфузію протягом 25 год, з швидкістю 1 мкг/год, для внутрішньошлуночкової інфузії катіонних ліпосом з плазмідним вектором, який ніс ген апоЕ3 (5 щурів).

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

– *ЧМТ+Пл* — тваринам завдавали експериментальної ЧМТ (у такий самий спосіб, як і в групі *ЧМТ*) і протягом кількох хвилин встановлювали канюлю (як і в групі *Пл*) (6 тварин).

Тяжкої ЧМТ завдавали щурам шляхом вільного падіння вантажу вагою 450 г з висоти 1,5 м. Моделювання експериментальної ЧМТ і всі подальші хірургічні маніпуляції, пов'язані з встановленням канюлі та введенням відповідних розчинів, виконували під загальним наркозом, який забезпечували внутрішньом'язовою ін'єкцією розчину кетаміну в дозі 0,7 мг/кг. Як лікувальний препарат досліджували комплекс катіонних ліпосом DOTAP Methosulfate (виробництво Sigma, США) і 25 мкг плазмідного вектора рСМV·SPORT6 (виробництво Invitrogen, США), що містить ген апоЕ3 людини, під контролем цитомегаловірусного промотору.

Проводили морфологічне дослідження (світлоптическое, електронно-мікроскопічне, імуногістохімічне з конфокальною мікроскопією, морфометричне), вивчали розлади дослідницької поведінки та емоційного стану тварин. Для порівняльного гістологічного

дослідження змін структури мозку у тварин різних груп щурів умертвляли через 10 діб після травми шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції летальної дози тіопентал-натрію (200 мг/кг). Мозок обережно вилучали з порожнини черепа, макроскопічно оцінювали стан м'яких оболонок, рельєф, наявність крововиливів, локалізацію видимих вогнищ забою. Мозок фіксували у 4% розчині параформальдегіду. З фіксованого мозку вирізали фронтальні блоки, які обробляли за стандартною методикою. З одержаних блоків виготовляли серійні зрізи товщиною 5–7 мкм, які фарбували гематоксиліном і еозиним, тіоніном за Ніслем. Іншу частину серійних зрізів використовували для імуногістохімічного дослідження. Для ультраструктурного дослідження ультратонкі зрізи товщиною 60–70 нм контрастували 2% розчином ураніацетату й свинцю цитрату, досліджували з використанням електронного мікроскопа ПЕМ-125К («Selmi», Україна) за прискорювальної напруги 60 кВ. Імуногістохімічне дослідження включало виявлення нейронів за маркером NeuN (зелена флуоресценція), астроцитів — за маркером GFAP (червона флуоресценція). Після цього зрізи досліджували у конфокальному мікроскопі FV1000-BX61WI (Olympus, Japan). Морфометричне дослідження передбачало визначення лінійної щільності (ЛЩ) нейронів, гліоцитів — сумарно астроцитів і олігодендроцитів та мікрогліоцитів зони СА1 гіпокампа, тобто, кількості клітин на одиницю його довжини (1 мм).

Дослідницьку поведінку та емоційний стан щурів досліджували на 7-му добу після травми (операції), у контрольних тварин — у тесті «відкрите поле». Експериментальна установка являла квадратну камеру розмірами 90×90 см з пластмасовими чорними стінками заввишки 49 см, освітлену єдиним інтенсивним джерелом світла (електричною лампою). Пластикову підлогу апарата розкреслено 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 вміщували в кут установки і спостерігали за її поведінкою протягом 5 хв. Дослідницьку поведінку оцінювали, підраховуючи кількість квадратів, які тварина перетинала всіма чотирма лапками протягом періоду спостереження (досліджували загальну кількість, а також кількість периферійних і центральних квадратів окремо), кількість вертикальних стійок і заглядань у нірки. Для додаткової оцінки емоційного стану тварин оцінювали кількість епізодів грумінгу (активної поведінки тварин, спрямованої на очищення поверхні тіла, тобто вмивання, вилизування шерсті) і кількість епізодів дефекації (фекальних болосів) впродовж 5 хв.

Статистична обробка даних проведена з використанням непараметричного методу оцінки Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення. Через 10 діб після ЧМТ відзначене порушення цитоархітектоніки гіпокампа. За даними морфометричного аналізу ЛЩ нейронів щурів зменшилася в 1,4 рази. На цьому фоні виявлені зміни якісного складу їх популяції — збільшення кількості гіперхромних деструктивних форм (з 7,8 до 55,4%) та зменшення незмінених форм (з 89,2 до 55,4%). ЛЩ макрогліоцитів збільшилась на

41%, мікрогліоцитів — у 4,5 рази. Виявлені значні деструктивно-дистрофічні зміни в усіх клітинних елементах гіпокампа: набряк перикапілярних структур, пошкодження аксонів і мієліну (аж до його дезагрегації, порушення ламелярної структури, формування здуттів і випинань), порушення синаптичного апарату, а також дистрофічні зміни у вигляді значного накопичення ліпофусцину й залишкових тілець у нейронах і гліоцитах. Під впливом генної терапії відзначене зменшення вираженості деструктивно-дистрофічних змін, зумовлених ЧМТ. ЛЩ нейронів зменшувалась значно менше (на 24%), покращувався якісний склад популяції (43,8% незмінених і 53,7% — гіперхромних нейронів). ЛЩ макрогліоцитів збільшувалась на 23%, мікрогліоцитів — у 3,7 рази. Структура аксонів і мієлінових оболонок значною мірою нормалізувалась, зменшилась кількість ліпофусцину й залишкових тілець у нейронах і перикапілярних ніжках астроцитів.

Характерним проявом ураження гіпокампа за тяжкої дифузної ЧМТ в експерименті є активізація нейрон-гліальних відносин. За даними імуноцитохімічного конфокально-мікроскопічного дослідження виявлено гіпертрофію тіл астроцитів, збільшення їх об'єму, кількості відростків астроцитів та їх розмірів, посилення розгалуження відростків, зміни характеру розгалуження відростків астроцитів з зірчастого на кушастий. При цьому тіла астроцитів наближались до шару нейронів, збільшувалася площа контакту нейронів та астроцитів, відростки астроцитів рясно проникали між нейронами пірамідного шару. Ліпосомальна трансфекція клітин головного мозку плазмідним вектором, що несе ген ізоформи $\varepsilon 3$ апоЕ людини, позитивно впливала на структуру й ультраструктуру гіпокампа, у тому числі зменшуючи кількість астроцитів у його радіальному шарі та нормалізуючи їх структуру (форма розгалуження відростків у групі ЧМТ+Пл переважно зірчаста, як у контролі).

Результати дослідження дослідницької поведінки та емоційного стану свідчили, що щури групи *Контроль* впродовж 5 хв відвідували у середньому (65,4±7,33) квадрати «відкритого поля». У тварин групи ЧМТ травма спричиняла значне пригнічення спонтанної дослідницької поведінки у порівнянні з такою в групі *Контроль* на 7-му добу після ЧМТ. Кількість квадратів «відкритого поля», відвіданих травмованими тваринами протягом 5 хв, становила 22,4±6,07, що складало 34,3% від показника в інтактних тварин (P=0,009). Зниження спонтанної дослідницької активності супроводжувалось появою «фризінгової» поведінки (freezing — замерзання), коли тварина «завмирає» на місці, частіше в кутку «відкритого поля» й припиняє досліджувати навколишнє середовище. Вважають, що така поведінка відображає підвищений рівень стресу й тривожності та не зумовлена недостатністю сенсорної або рухової сфери. Подібних завмирань ми не спостерігали у контрольних тварин, які продовжували безперервно досліджувати нову обстановку.

Проведення травмованим тваринам генної терапії, спрямованої на індукцію синтезу в нервовій тканині ізоформи $\varepsilon 3$ АпоЕ (група ЧМТ+Пл), сприяло відновленню спонтанної дослідницької поведінки, що відображало зниження в них рівня стресу й тривожності. Кількість відвіданих квадратів «відкритого поля» на 7-му добу після травми становила 49,5±6,47,

що, на відміну від групи ЧМТ, складало 75,7% від показника у контрольних тварин. І хоча цей показник не сягав норми, тобто, значень у групі *Контроль* ($P=0,011$), він достовірно перевищував такий у групі ЧМТ ($P=0,006$).

Подальша оцінка впливу ліпосомальної трансфекції тканини головного мозку плазмідним вектором з геном апоЕ3 на вираженість стресу й тривожності у щурів з ЧМТ стосувалась оцінки їх звикання до нової обстановки, що характеризувалося активнішим дослідженням центральної частини «відкритого поля». За нашими даними, перебування в периферійних квадратах «відкритого поля» відповідало закономірностям, характерним для загальної кількості відвіданих квадратів. Так, середня 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 в групі *Контроль* ($59,6 \pm 7,09$) ($P=0,009$). Проведене тваринам групи ЧМТ+Пл лікування сприяло збільшенню кількості відвіданих периферійних квадратів на 7-му добу після травми до $46,8 \pm 7,19$ (79,3% від показника в інтактних тварин), хоча й без достовірної нормалізації ($P=0,018$ при порівнянні з групою *Контроль*), проте, з достовірним перевищенням показника у порівнянні з таким у тварин групи ЧМТ ($P=0,006$).

Дещо інший тренд відзначений щодо відвідання тваринами центральних квадратів «відкритого поля». У порівнянні з групою *Контроль* (число відвідань центральних квадратів $5,8 \pm 2,95$), травма спричинила такий рівень стресу й тривожності, що на 7-му добу спостерігали відсутність звикання до нового середовища — ($1,8 \pm 0,84$) відвідування ($P=0,016$). У той же час, проведення генної терапії з використанням гену апоЕ3 сприяло збільшенню кількості відвіданих центральних квадратів до $4,33 \pm 1,21$, що не відрізнялось від показника в інтактних тварин ($P=0,411$) і достовірно перевищувало дані в групі ЧМТ ($P=0,011$).

Під час вивчення інших аспектів дослідницької поведінки щурів, зокрема, вертикальної активності, встановлено, що кількість вертикальних стійок в групі ЧМТ на 7-му добу після травми становила $7,6 \pm 2,88$, у *Контролі* — $19,6 \pm 2,79$ ($P=0,009$). Проведене лікування тварин групи ЧМТ+Пл сприяло відновленню вертикальної активності — ($15,3 \pm 3,88$) стійки (різниця з показником у групі *Контролю* 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 після ЧМТ ($0,6 \pm 0,55$ епізоди, $P=0,009$). Ліпосомальна трансфекція тканини головного мозку щурів з ЧМТ плазмідним вектором, що несе ген апоЕ3, сприяла відновленню цього показника в групі ЧМТ+Пл ($3,2 \pm 1,17$ епізодів заглядання в нірки; різниця з показником в групі *Контролю* недостовірна, $P=0,235$) з достовірною відмінністю від результатів у групі ЧМТ ($P=0,006$).

У дослідженні не виявлений вплив як ЧМТ, так і проведеного нами лікування, на такі показники емоційного стану тварини, як «грумінг» і кількість фекальних кульосів.

Таким чином, генна терапія, спрямована на індукцію синтезу ізоформи $\epsilon 3$ АпоЕ головному мозку щурів

при експериментальній ЧМТ, справляє позитивний вплив на структуру й ультраструктуру гіпокампа, зменшує загибель нейронів, ступінь дифузної ушкодження аксональних, гліоз та мікрогліальну реакцію, а також сприяє регресу посттравматичного функціонального дефіциту.

Незважаючи на те, що вплив АпоЕ на перебіг різних захворювань ЦНС, у тому числі ЧМТ, відомий досить давно, автори оглядів літератури і експериментальних робіт, опублікованих у 2007–2011 рр., наголошують, що точні механізми, за допомогою яких АпоЕ впливає на обмеження структурних проявів і функціональних наслідків ЧМТ та інших нейродегенеративних захворювань, сьогодні недостатньо досліджені [4–8]. Найбільш доведеним поясненням ефектів АпоЕ можуть бути вплив на нейрогенез, запальну відповідь, процесинг амілоїду- β і метаболізм нейронів [4].

Роль АпоЕ в нормалізації балансу ліпідів у нервовій тканині доведена в огляді літератури P.S. Hauser та співавторів [5]. Автори відзначають, що насичення тканини головного мозку ліпопротеїнами, що містять АпоЕ, означає його участь у транспорті й обміні холестерину в ЦНС. Холестерин необхідний для утворення синапсів, формування дендритів, тривалої потенціалізації та керування ростом аксонів. Холестерин, доставлений у нейрони в складі АпоЕ-вмісних ліпопротеїнів, активує формування синапсів, стимулюючи біогенез синаптичних везикул та роботу апарату, необхідного для їх вивільнення. Після пошкодження нейрону, його загибелі, травматичного пошкодження головного мозку велика кількість холестерину втрачається внаслідок деградації мембран і мієліну. У відповідь на це синтез АпоЕ посилюється в астроцитах і макрофагах — клітинах, у яких він першочергово задіяний у процесах перерозподілу й кліренсу холестерину та залишків ліпідів. Накопичено значну доказову базу, що свідчить про критично важливу роль АпоЕ у відповіді ЦНС на травму переважно шляхом транспортування холестерину та ліпідів з вогнища ушкодження, а також сприяння репарації нервової тканини.

D.T. Laskowitz, M.P. Vitek [6] детально проаналізували результати власних досліджень і дані літератури, що стосуються ролі АпоЕ в регуляції гліальних реакцій і запальної відповіді ЦНС на травму. У дослідженнях *in vitro* АпоЕ у фізіологічній концентрації модифікує активацію астроцитів і мікроглії, а також секрецію ними медіаторів запалення. Зокрема, АпоЕ пригнічує секрецію фактору некрозу пухлин- α (ФНП- α) в культурі мікрогліоцитів людини. Такий ефект є алель-специфічним і ізоформа-специфічним, що підтверджується більш вираженим нейрозапаленням у трансгенних тварин з генотипом апоЕ4, порівняно з апоЕ3, при моделюванні системної запальної реакції у мишей. При подальшому використанні трансгенних тварин при експериментальній ЧМТ виявлені гірші наслідки травми в АпоЕ-дефіцитних мишей і відзначено, що ключовим чинником, який визначає такий результат, є дизрегуляція гліальних функцій і нейрозапальної відповіді. Автори дійшли висновку, що провідною складовою захисних властивостей АпоЕ при ЧМТ є модифікація запальної відповіді в головному мозку.

У кількох дослідженнях продемонстровано участь АпоЕ у функціонуванні системи антиоксидантного

захисту головного мозку. Так, у фізіологічній концентрації АпоЕ значно знижує H_2O_2 -індуковану загибель нервових клітин [9]. Антиоксидантний ефект цього білка виявився алель-специфічним. Захисна ефективність ізоформ АпоЕ зменшувалась у порядку $\epsilon 2 > \epsilon 3 > \epsilon 4$, при цьому протекторні властивості ізоформи $\epsilon 2$ були удвічі більшими, ніж $\epsilon 4$ [10]. При дослідженні макрофагів з генотипом апоЕ4 у клітинній культурі встановлено підвищену оксидацію мембран, більшу продукцію реактивних сполук кисню й азоту у відповідь на стимуляцію токсинами — бактеріальним ліпополісахаридом і пара-метоксиамфетаміном [11].

У дослідженнях останніх років відзначено наявність прямої антиапоптозної дії АпоЕ. Зокрема, Н. Hayashi і співавтори [12] показали, що АпоЕ3, зв'язуючись з білком рецептору ліпопротеїнів низької щільності (low-density lipoprotein receptor-related protein), гальмує апоптоз нейронів через включення шляху внутрішньоклітинної сигналізації, який передбачає активацію протеїнкінази С δ та інактивацію глікоген-синтазної кінази 3 β . Інші дослідники [13] показали, що експресія гена апоЕ є реакцією на індукцію апоптозу в культурі нейрональних клітин і може відображати роль АпоЕ у кліренсі апоптозних тілець з застосуванням механізмів взаємодії між АпоЕ та відповідними рецепторами.

Також показано, що апоЕ-генотип і, отже, експресія тих чи інших ізоформ відповідного білка реалізують протекторні властивості АпоЕ через посилення чи гальмування експресії багатьох інших генів. F. Crawford і співавторами [4] з використанням технології Microarray у мишей з ЧМТ визначили геномну відповідь гіпокампа на травму залежно від апоЕ-генотипу. Показано, що у трансгенних тварин з апоЕ3-генотипом посилюється експресія 621 гена, знижується — 86, у мишей з генотипом апоЕ4, який пов'язують з менш ефективною відповіддю нервової тканини на травму, відповідно 207 і 74 генів. Зміни експресії стосувалися груп генів, що регулюють рухомість клітин, морфологію тканин, імунну відповідь, міжклітинну сигналізацію та взаємодію, запальну відповідь, ріст клітин та проліферацію, метаболізм ліпідів і смерть клітин. Усі ці функції задіяні в процесі активації макро- та мікроглії та регуляції запальної відповіді на травматичне ураження головного мозку.

Під час розробки сучасних методів лікування ЧМТ, як правило, звертають увагу на наступне. Перешкодою до ефективного лікування травматичного ураження головного мозку часто є значна кількість шляхів загибелі клітин, багато з яких перекриваються, а також різноманітні молекулярні механізми патогенезу і нетривалі «терапевтичні вікна» для деяких видів смерті клітин [14]. Поряд з нейрон-специфічними шляхами патогенезу ЧМТ значну роль

відіграє вторинна нейротоксичність, що є наслідком мікрогліальних запальних реакцій [15]. Саме цим можна пояснити відсутність успіху клінічних випробувань різних засобів нейропротекції при ЧМТ, спрямованих на окремі ланки патогенезу смерті клітин або на ті з них, вплив на які дуже обмежений у часі [14]. Більше того, вважають, що гальмування одного з шляхів загибелі клітин (некротичного або апоптозичного) може активувати інший [16, 17]. Ця думка підтверджується спостереженнями, що пригнічення апоптозу може сприяти активації інших, неапоптозних, варіантів програмованої смерті клітин [18]. З огляду на зазначене, такі методи лікування ЧМТ в експерименті та клініці, спрямовані на обмежену кількість «мішеней», вважають сьогодні симплікаційними, і припускають, що успіх матимуть стратегії лікування, що впливають на різні механізми загибелі клітин і множинні фактори вторинного ураження головного мозку [14, 19]. Таке припущення підтверджується результатами доклінічних випробувань, в яких оцінювали ефективність при ЧМТ мультипотентних терапевтичних агентів з поліфункціональною активністю, зокрема, малих циклічних дипептидів, прогестерону, статинів, еритропоетину тощо [20]. Зважаючи на позитивний лікувальний ефект АпоЕ3 при експериментальній ЧМТ у нашому дослідженні, можемо вважати, що ця ізоформа АпоЕ належить до таких мультипотентних агентів. Можливими точками прикладання їх дії можуть бути (*див. схему*): 1) вплив АпоЕ на нормалізацію ліпідного компоненту нервових клітин; 2) роль АпоЕ в регуляції гліальних реакцій і запальної

I	<p>Метаболічний стрес (АТФ↓, лактат↑) Іонний дисбаланс (Ca²⁺, Na⁺, K⁺) Вивільнення цитокінів Порушення гематоенцефалічного бар'єру Церебральний крововилив Пошкодження мембран Формування вогнищевого забою Первинна аксотомія</p>	
II	<p>Ексайтотоксичність Оксидантний стрес (вільні радикали) набряк глії Запалення Некроз Вторинна аксотомія</p>	
III	<p>Порушення внутрішньоклітинної сигналізації Диференційована експресія генів Апоптоз Порушення аксонального транспорту Валерівська дегенерація</p>	
IV	<p>Формування інфаркту Атрофія мозку Функціональний дефіцит</p>	

Схема патогенетичних механізмів ЧМТ [1, 21]. Чотири фази посттравматичного періоду виділені для розподілу усіх процесів на негайні, гострі, підгострі та наслідкові. Овалами означені відомі точки прикладання лікувальної дії АпоЕ.

відповіді ЦНС на травму; 3) антиоксидантні ефекти АпоЕ; 4) участь АпоЕ у регуляції процесів смерті клітин; 5) вплив АпоЕ на експресію інших генів і регуляція геномної відповіді клітин ЦНС за її захворювань і пошкодження. Слід зазначити, що деякі з цих ефектів реалізуються шляхом універсальних клітинних і тканинних реакцій, активації спільних каскадів внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації. Тому, інколи зазначені механізми виглядають настільки взаємопов'язаними, що їх важко відділити один від одного, а запропонований розподіл сприяє радше полегшенню класифікації та викладення матеріалу, ніж дозволяє остаточно пояснити складний молекулярний феномен, яким є роль АпоЕ в життєдіяльності нервової тканини.

Висновки. 1. Генна терапія шляхом ліпосомальної трансфекції тканини головного мозку плазмідним вектором, що несе ген апоЕ3, ефективно гальмує вторинне пошкодження гіпокампа за тяжкої дифузної ЧМТ в експерименті, що супроводжується меншою вираженістю та швидшим регресом функціональних наслідків травми.

2. Можливими механізмами лікувальної дії АпоЕ3 при ЧМТ є вплив АпоЕ на нормалізацію ліпідного компоненту нервових клітин, роль АпоЕ в регуляції гліальних реакцій і запальної відповіді ЦНС на травму, антиоксидантні ефекти АпоЕ, участь АпоЕ у регуляції процесів смерті клітин, вплив АпоЕ на експресію інших генів і регуляція геномної відповіді клітин ЦНС.

Список літератури

1. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the "golden bullet"? / K. Beauchamp, H. Mutlak, W.R. Smith [et al.] // *Mol. Med.* — 2008. — V.14, N11–12. — P.731–740.
2. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective / A.A. Hyder, C.A. Wunderlich, P. Puvanachandra [et al.] // *NeuroRehabilitation.* — 2007. — V.22, N5. — P.341–353.
3. Traumatic brain injury in the United States: a public health perspective / D.J. Thurman, C. Alverson, K.A. Dunn [et al.] // *J. Head Trauma Rehabil.* — 1999. — V.14, N6. — P.602–615.
4. 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.
5. Hauser P.S. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology / P.S. Hauser, V. Narayanaswami, R.O. Ryan // *Prog. Lipid Res.* — 2011. — V.50. — P.62–74.
6. 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.
7. Apolipoprotein E and central nervous system disorders: reviews of clinical findings / M. Takeda, R. Martinez, T. Kudo [et al.] // *Psychiat. Clin. Neurosci.* — 2010. — V.64. — P.592–607.
8. Verghese P.B. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders / P.B. Verghese, J.M. Castellano, D.M. Holtzman // *Lancet Neurol.* — 2011. — V.10. — P.241–252.
9. Apolipoprotein E protects against oxidative stress in mixed neuronal-glia cell cultures by reducing glutamate toxicity / Y. Lee, M. Aono, D. Laskowitz [et al.] // *Neurochem. Int.* — 2004. — V.44, N2. — P.107–118.
10. Miyata M. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides / M. Miyata, J.D. Smith // *Nat. Genet.* — 1996. — V.14. — P.55–61.
11. Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on markers of oxidative status in macrophages / L. Jofre-Monseny, S. de Pascual-Teresa, E. Plonka [et al.] // *Br. J. Nutr.* — 2007. — V.97. — P.864–871.
12. 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.
13. Apoptosis induces neuronal apolipoprotein-E synthesis and localization in apoptotic bodies / D.A. Elliott, W.S. Kim, D.A. Jans, B. Garner // *Neurosci. Lett.* — 2007. — V.416. — P.206–210.
14. 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.
15. Byrnes K.R. Metabotropic glutamate receptors as targets for multipotential treatment of neurological disorders / K.R. Byrnes, D. Loane, A.I. Faden // *Neurotherapeutics.* — 2009. — V.6. — P.94–107.
16. 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. — V.96, N5. — P.2508–2513.
17. Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: a mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis / G.W. Glazner, S.L. Chan, C. Lu, M.P. Mattson // *J. Neurosci.* — 2000. — V.20. — P.3641–3649.
18. Bredesen D.E. Key note lecture: toward a mechanistic taxonomy for cell death programs / D.E. Bredesen // *Stroke.* — 2007. — V.38, N2, suppl. — P.652–660.
19. Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury / R. Raghupathi // *Brain Pathol.* — 2004. — V.14. — P.215–222.
20. 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.
21. 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.

Надійшла до редакції 10.01.12

Прийнята до публікації 17.02.12

Адреса для листування:

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

Белошицкий В.В.

Лечебное воздействие изоформы $\epsilon 3$ аполипопротеина E на патофизиологические механизмы вторичного повреждения головного мозга при экспериментальной черепно-мозговой травме

Институт нейрохирургии
им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины,
отделение нейротравмы, г. Киев

Цель. Изучить терапевтические возможности применения изоформы $\epsilon 3$ аполипопротеина E, синтез которой в нервной ткани индуцирован методом генной терапии, при экспериментальной черепно-мозговой травме (ЧМТ) и на основании анализа данных литературы объяснить возможные механизмы его лечебного действия.

Методы. Структурные и функциональные изменения оценивали у взрослых крыс-самцов линии Вистар на 10-е сутки после тяжелой диффузной ЧМТ, воспроизведенной на модели «ударного ускорения» падающим грузом. После ЧМТ комплекс катионных липосом ДОТАП и 25 мкг плазмидного вектора pCMV-APOE3 вводили в желудочек мозга с помощью осмотических помп ALZET. Оценивали СА1 поля гиппокампа с помощью световой и электронной микроскопии, морфометрии, иммуноцитохимического и конфокально-микроскопического исследования с использованием селективных маркеров нейронов (NeuN) и астроцитов (GFAP). Функциональный исход травмы оценивали в тесте «открытое поле».

Результаты. По данным экспериментального исследования, липосомальная трансфекция геном апоE3 оказывает положительный лечебный эффект на структуру и ультраструктуру гиппокампа, уменьшает гибель нейронов, степень диффузного повреждения аксонов, глиоз и микроглиальную реакцию, а также способствует регрессу посттравматического стресса и тревожности.

Вывод. По данным литературы, возможными механизмами лечебного действия АпоE3 являются влияние аполипопротеина E на нормализацию липидного компонента нервных клеток, роль аполипопротеина E в регуляции глиальных реакций и воспалительного ответа ЦНС на травму, антиоксидантные эффекты аполипопротеина E, участие аполипопротеина E в регуляции процессов смерти клеток, влияние аполипопротеина E на экспрессию других генов и регуляция геномного ответа клеток ЦНС на травму.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, генная терапия, аполипопротеин E, изоформа $\epsilon 3$, механизм лечебного действия

Поступила в редакцию 10.01.12
Принята к публикации 17.02.12

Адрес для переписки:

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

Biloshytsky V.V.

The therapeutic influence of $\epsilon 3$ isoform of apolipoprotein E on pathophysiological mechanisms of secondary brain injury evolution after experimental traumatic brain injury

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

Purpose. To test the therapeutic potential of apolipoprotein E isoform $\epsilon 3$, whose synthesis in nerve tissue was induced by means of gene therapy, in an experimental traumatic brain injury (TBI) model, and to substantiate its mechanism of therapeutic action based on current literature data.

Methods. To determine structural and functional changes associated with severe diffuse TBI, adult male Wistar rats were subjected to weight drop impact acceleration injury and evaluated at day 10 after trauma. A mixture of DOTAP liposomes and 25 μ g of recombinant plasmid pCMV-APOE3 cDNA was infused intraventricularly immediately after TBI using ALZET osmotic pumps. The hippocampal CA1 regions were analyzed by means of light and electron microscopy, morphometry, immunocytochemical and confocal analysis using markers selective for neurons (NeuN) and astrocytes (GFAP). The neurofunctional outcome was assessed in an open field test.

Results. The research data have shown that cationic liposome-mediated APOE3 gene transfer has a beneficial effect on hippocampal structure and ultrastructure, diminishes neuronal loss and severity of diffuse axonal injury, gliosis and microglial reaction, as well as aids regression of posttraumatic stress and anxiety.

Conclusion. According to literature data, possible mechanisms of apoE therapeutic action are (1) normalization of neural cellular lipid component, (2) its role in regulating reactive gliosis and inflammatory response of CNS to injury, (3) antioxidant effects of apolipoprotein E, (4) regulation of cell death mechanisms, (5) influence of apolipoprotein E on differential gene expression and regulation of genomic response of CNS cells to injury

Key words: traumatic brain injury, gene therapy, apolipoprotein E, isoform $\epsilon 3$, mechanism of therapeutic action.

Received January 10, 2012

Accepted February 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. «Лікувальний вплив ізоформи ε3 аполіпопротеїну Е на патофізіологічні механізми вторинного ураження головного мозку при експериментальній черепно-мозковій травмі»

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) посідає одне з провідних місць у структурі захворюваності й смертності в усьому світі. Досягнуте в недавньому минулому поліпшення наслідків ЧМТ зумовлене успіхами у розвитку інтенсивної терапії, нейрохірургічної техніки та реабілітації. Наступним кроком має стати розробка ефективної фармакотерапії ЧМТ, проте, у більшості клінічних досліджень у цьому напрямку бажані цілі не досягнуті, що може бути зумовлене недостатнім розумінням складного багатовимірного патогенезу ЧМТ.

Стаття є продовженням низки публікацій про можливість генної терапії в гострому періоді ЧМТ, що є новим і сучасним напрямком у нейрохірургії. Стаття побудована за загальноприйнятим планом. Крім результатів дослідження впливу аполіпопротеїну Е,

синтез якого в травмованій ЦНС індукований методом генної терапії, на структурні та функціональні прояви тяжкої ЧМТ в експерименті, стаття містить простору довідку про вплив аполіпопротеїну Е на метаболізм і функцію клітин головного мозку. Аналізуючи дані літератури, автор показує, що успіх у лікуванні ЧМТ матимуть методи лікування, які впливатимуть на різні механізми загибелі клітин і численні фактори вторинного ураження головного мозку. Терапевтичним агентом з подібною поліфункціональною активністю може стати аполіпопротеїн Е.

З огляду на зазначене, подальше вивчення можливостей аполіпопротеїну Е як терапевтичного агента і генної терапії як методу лікування ЧМТ є перспективним і потребує продовження.

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