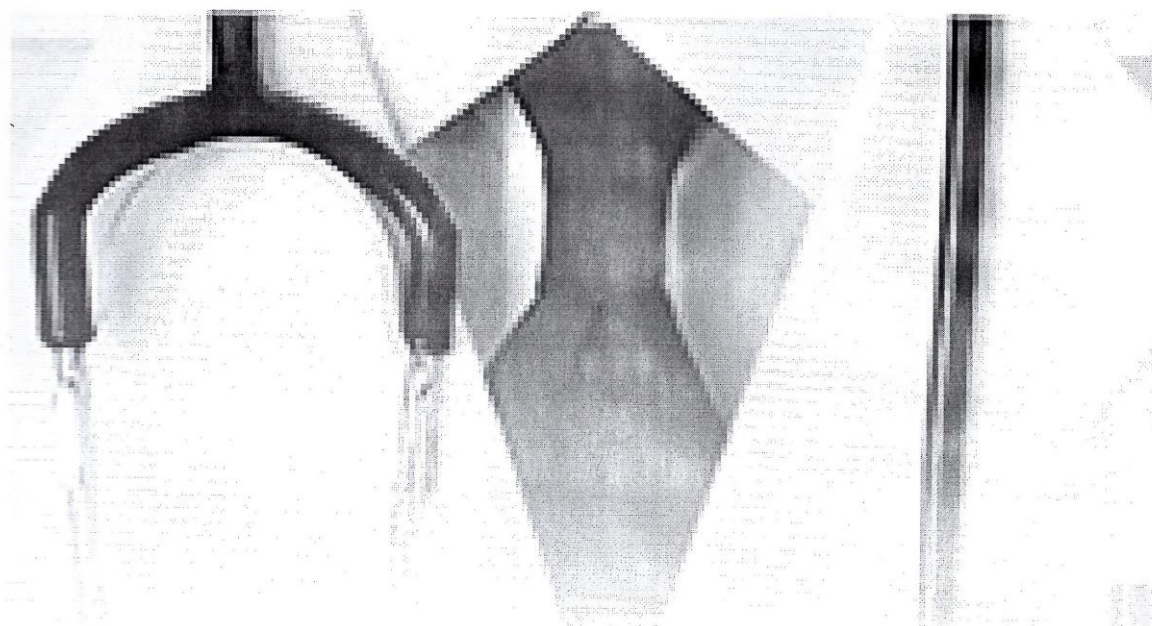
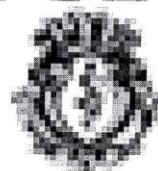


ISSN 2543-7847
pauza 2018

Wiadomości Lekarskie

Compendium Lekarskie / Compendium Lekarskie

ISSN 2543-7847



03/2018

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА ТЕРАПЕВТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЛІПОСОМНОЇ ТРАНСФЕКЦІЇ ГЕНУ APOE3 ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF LIPOSOME-MEDIATED APOE3 GENE TRANSFECTION FOR

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА ТЕРАПЕВТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЛІПОСОМНОЇ ТРАНСФЕКЦІЇ ГЕНУ APOE3 ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF LIPOSOME-MEDIATED APOE3 GENE TRANSFECTION FOR CEREBRAL ATHEROSCLEROSIS

Вадим В. Білошицький¹, Аліса В. Пачевська², Аліна В. Білошицька², Валерій М. Істошин²,
Марина В. Білошицька¹, Ольга Б. Шевня²

¹ІНСТИТУТ НЕЙРОХІРУРГІЇ ІМ. АКАД. А. П. РОМОДАНОВА НАМН УКРАЇНИ, КИЇВ, УКРАЇНА

²ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М. І. ПИРОГОВА, ВІННИЦЯ, УКРАЇНА

Vadym V. Biloshytskyi¹, Alisa V. Pachevska², Alina V. Biloshytska², Valerii M. Istoshyn²,
Maryna V. Biloshytska¹, Olga B. Shevnia²

¹INSTITUTE OF NEUROSURGERY NAMED AFTER ACAD. AP. ROMODANOV ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE, KYIV, UKRAINE

²NATIONAL PIROGOV MEMORIAL MEDICAL UNIVERSITY, VINNYTSYA, UKRAINE

РЕЗЮМЕ

Вступ: Протягом останніх років інсульт є причиною високої летальності, тривалої та стійкої інвалідизації, проблема профілактики якого ще далеко не вирішена. Першопричиною розвитку інсульту вважається атеросклероз.

Мета: Вивчення нейротрофічної та нейропротекторної функції apoE в тканині мозку щура при експериментальному атеросклерозі.

Матеріали та методи: Дослідження проведено на 60 статевозрілих щурах. Модель експериментального атеросклерозу створювали за методом Анічкова. Підослідні тварини були розділені на 3 групи: контрольна, дослідна та група тварин з експериментальним атеросклерозом, яким в перший день моделювання атеросклерозу вводили внутрішньом'язово ген аполіпопротеїну E (apoE) в дозі 50 мкг ДНК на тварину).

Результати: Морфологічне дослідження кори в III і V шарах тварин з експериментальним атеросклерозом показало кількісну і якісну зміну клітинного складу. Нейрони були атрофічно та деструктивно змінені; спостерігався каріопікноз та каріолізис, часто ядра не візуалізувались. Зменшилася кількість нормохромних клітин (до 50-ти %), гіпохромних клітин (до 4%), в 2 рази збільшилася кількість гіперхромних нейронів (до 10%), спостерігалися також різкогіперхромні нейрони (до 20%) і різкогіпохромні нейрони (до 10 %) та без'ядерні клітини — «клітини-тіні». Експериментальний атеросклероз призводив до суттєвого збільшення прошарків нейроглії, збільшення діаметру просвіту судин за рахунок потовщення внутрішнього та середнього шарів. Генна терапія мала виражену нейропротекторну дію, приводила до відновлення кількісного і якісного складу нейронів, зменшення товщини судин та збільшення їх просвіту.

Висновки: Експериментальне холестеролове навантаження призводить до вираженої дистрофії клітин сенсомоторного шару кори головного мозку щурів. Отримані дані свідчать про позитивну профілактичну дію генної трансфекції на якісний та кількісний клітинний склад та стан судинного русла кори головного мозку експериментальних тварин та потребують подальшого перспективного дослідження.



КЛЮЧОВІ СЛОВА: атеросклероз, інсульт, генна терапія

ABSTRACT

Introduction: In recent years, a stroke has been the cause of high lethality, long-term and sustained disability, the problem of which is still far from being resolved. The root cause of stroke is atherosclerosis.

Conclusions: Experimental cholesterol loading leads to pronounced dystrophy of cells of the sensorimotor layer in rat cerebral cortex. The obtained data confirm the positive preventive effect of gene transfection on the qualitative and quantitative cellular composition and the state of the vascular bed of rat cerebral cortex. The further prospective study is needed.

KEY WORDS: atherosclerosis, stroke, gene therapy

Wiad Lek 2018, 71, 3 cz. I, 460-468

ВСТУП

Протягом останніх років серцево-судинні захворювання посідають перше місце в структурі смертності більшості населення України [1]. Загальновідомо, що основна причина серцево-судинних захворювань - атеросклероз. Як свідчать результати популяційних досліджень, проведених в Національному науковому центрі «Інститут кардіології ім. акад. М.Д.Стражеска НАМН України», гіперхолестеринемія виявляється у 44%, гіпертригліцеридемія - у 23% мешканців України, а гіпо-альфахолестеринемію - знижений вміст в сироватці крові антиатерогенних ліпопротеїнів високої щільності мають 26-28% населення віком понад 35 років [1]. Розвиток атеросклерозу веде до утворення в інтимі судини ліпідно-фіброзних бляшок, які зменшують просвіт та кровопостачання до серця, головного мозку, нирок, печінки, нижніх кінцівок [2]. Найзагрозливішими ускладненнями атеросклерозу є інфаркт міокарду та інсульт, які є причиною високої летальності, тривалої та стійкої інвалідизації, проблема лікування яких ще далеко не вирішена.

В нормі в печінці синтезуються та метаболізуються більша частина ліпопротеїнів, в тому числі - ліпопротеїнів дуже низької щільності, ліпопротеїнів низької щільності, ліпопротеїнів високої щільності [3]. Встановлено, що 75% рецепторів до ліпопротеїнів низької щільності знаходяться на мембрані гепатоцитів. Активними центрами ліганда є білки ароВ та ароЕ (аро означає білок; АРО означає відповідний ген). Було доведено, що головна функція гепатоцитів в підтриманні ліпідного гомеостазу полягає в синтезі апобілков та ліпопротеїнів, їх рецепторів, а також регуляції їх метаболічного балансу [4]. При довготривалому холестероловому навантаженні та високій концентрації холестерола в плазмі крові порушується ліпорегуляторна функція гепатоцитів [5], що може стати ініціюючим чинником у розвитку атеросклерозу судин головного мозку. Оскільки при атеросклерозі клітинами-мішенями є перш за все ендотеліюцити та нейרוцити головного мозку, то зміни в них розвиваються паралельно розвитку дисліпопротеїнемії, поступово прогресують, ведуть до типового пошкодження судинної стінки атеросклеротичним процесом та як наслідку - інсульту [6,7]. Для атеросклеротичного враження судин мозку характерні зміни, що відбуваються в судинах інших

органів [2]. Все вищеперераховане дає можливість стверджувати, що дисліпопротеїнемія викликає порушення структури і функції головного мозку [8]. У такій ситуації привертає увагу можливість корекції морфологічних змін в тканині мозку при експериментальному атеросклерозі шляхом профілактичного введення гену АРОЕ, адже на сьогоднішній день доведена зворотність морфологічних змін в інших органах при використанні генної терапії [9]. Дослідниками встановлена перспективність нейропротекції при черепно-мозкових травмах генною терапією - методом, що дозволяє індукувати в нервових клітинах пошкодженого мозку синтез тих чи інших білків з потенційним терапевтичним ефектом [4]. Протеїн, запуск або посилення синтезу якого є метою застосування генної терапії, може бути ензимом, структурним білком або виконувати іншу функцію [10]. На наш погляд, існує необхідність вивчення в експерименті методик генної терапії, спрямованих на гальмування процесу атеросклерозу та його морфологічного прояву в тканині головного мозку, і, внаслідок цього, на профілактику виникнення інсульту. В якості терапевтичних агентів при цьому може розглядатися ген АРОЕ, тому що вважається, що синтез білка ароЕ має найважливіше значення для репарації ліпідного компонента мембран глії і нейронів при пошкодженнях, це відбувається завдяки адекватному транспорту холестеролу і фосфоліпідів. Незважаючи на досить високий рівень знань про структуру та функції даної сполуки, існування гіпотез про його можливе лікувальний ефект при ушкодженнях мозку внаслідок атеросклеротичного процесу, в науковій літературі в даний час немає повідомлень про результати трансферу гена АРОЕ в клітини пошкодженої атеросклерозом ЦНС.

АроЕ - одноланцюговий білок, що складається з 299 амінокислот, входить до складу різних класів ліпопротеїнів плазми. АроЕ грає найважливішу роль в метаболізмі, транспорті і регуляції рівня холестерину і тригліцеридів [11]. У складі ліпопротеїнів, що містять високі рівні тригліцеридів, таких як ЛПНЩ і хиломікрони, ароЕ виконує функцію ліганда, що забезпечує їх ефективне зв'язування з рецепторами і захоплення клітинами печінки, в результаті чого досягається видалення надлишку тригліцеридів з плазми [12]. Дослідження також вказують на значення цього білка в регуляції синтезу ЛПДНЩ-триглі-

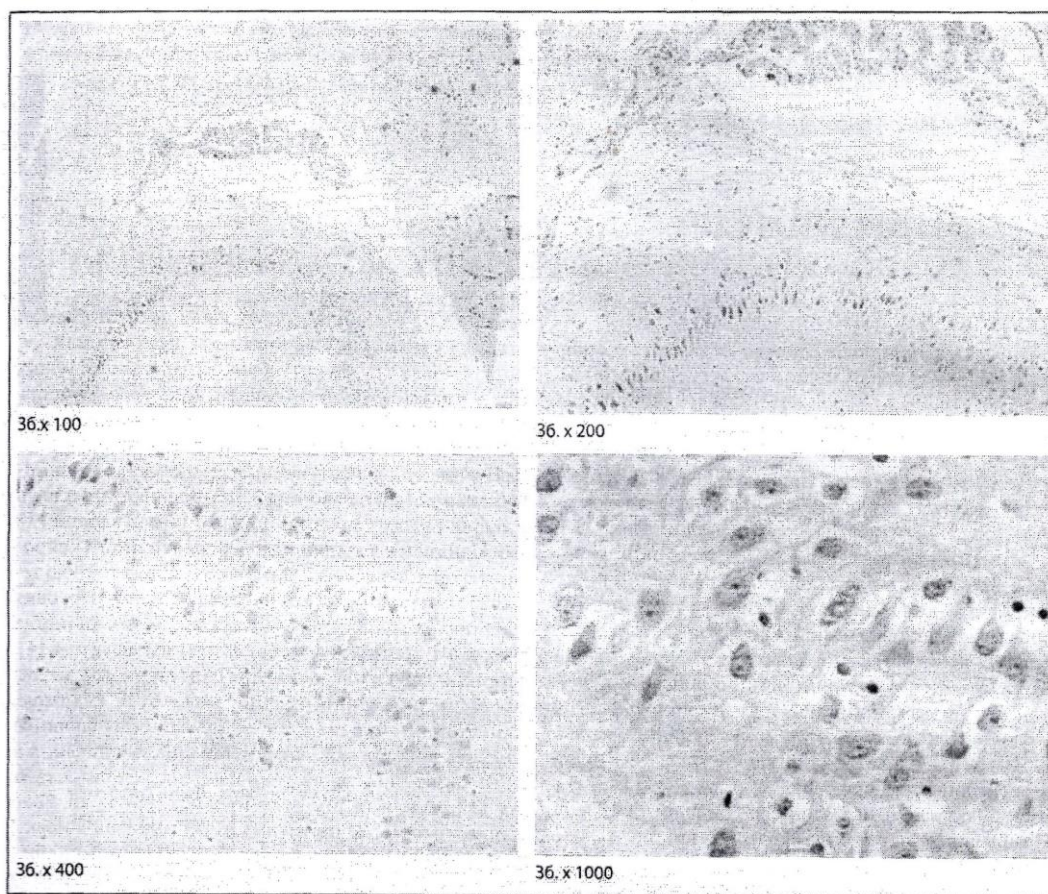


Рис. 1. Стан сенсомоторної зони кори головного мозку інтактної тварини. Забарвлення гематоксилін-еозином.

церидів в печінці [13]. Дослідження показали, що в ЦНС, аналогічно соматичним системам, також існує апоЕ- опосередкований механізм транспорту і підтримки гомеостазу ліпідів [14].

Існує три основні ізоформи білка АРОЕ, що відрізняються за наявністю аргініну або цистеїну в 112-й і 158-й позиціях амінокислотної послідовності: АРОЕ3(Сys112 / Arg158), АРОЕ4(Arg112 / Arg158) і АРОЕ2(Сys112 / Cys158)[15]. Найбільш поширений варіант в нормоліпідемічній популяції людей - АРОЕ3 [16, 17, 18]. Варіант АРОЕ2 дефектний щодо зв'язування з рецепторами. Відносні частоти генотипів АРОЕ2/ АРОЕ2, АРОЕ3/ АРОЕ2, АРОЕ4/ АРОЕ2, АРОЕ3/ АРОЕ3, АРОЕ4/ АРОЕ3 і АРОЕ4/ АРОЕ4 в людській популяції відповідно становлять 0.005, 0.127, 0.027, 0.564, 0.251, 0.027 [19]. Гризуни мають тільки один варіант гена АРОЕ, що кодує білок, який відрізняється від людського послідовністю з приблизно 30% амінокислот з карбоксильного кінця [20].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою дослідження стало вивчення нейротрофічної та нейропротекторної функції апоЕ в тканині мозку щура при експериментальному атеросклерозі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на 60 статевозрілих щурах-самцях масою 150-170 грамів, які утримувалися на стандартному раціоні в умовах науково-експериментальної клініки Вінницького національного медичного університету ім.М.І.Пирогова. Модель експериментального атеросклерозу створювали за класичним методом Анічкова шляхом згодовування тваринам холестеролу з соняшниковою олією. Піддослідні тварини були розділені на 3 групи. 1 група - інтактні тварини, які утримувались в звичайних умовах експериментальної клініки; 2 група - тварини з експериментальним атеросклерозом; 3 група - тварини з експериментальним атеросклерозом, яким в перший день моделювання атеросклерозу вводили

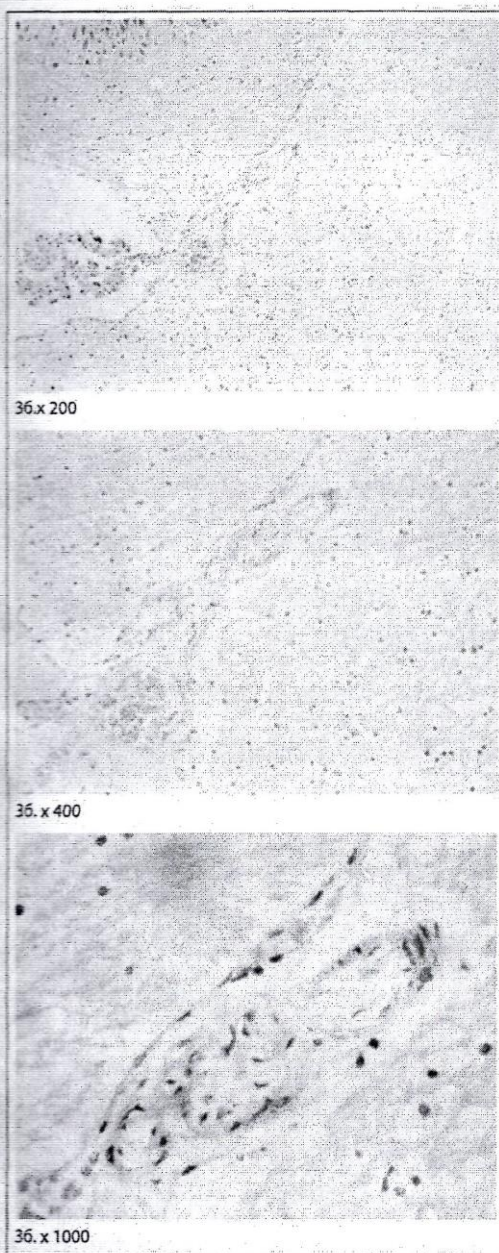


Рис. 2. Стан судин сенсомоторної зони кори головного мозку інтактної тварини. Забарвлення гематоксилін-еозином.

внутрішньому'язово плазмідний вектор, що містив ген APOE3 під контролем цитомегаловірусного промотора, в дозі 50мкг ДНК на тварину.

У дослідженні була використана клонована ДНК (кДНК) гена APOE3, субклонована в вектор pUC18 (плазміді pUCapoE), подарована Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України професором George Dickson та науковим співробітником Takis Athanasiou (факультет біохімії Королівського Лондонського університету). Ген APOE3 був переклонований у плазмідний вектор pCMV-SPORT6. Ефективність трансфекції (наявність APOE-мРНК) підтверджували за допомогою візуалізації продуктів ампліфікації (295 п.н. і 180 п.н., відповідно, для 1-ї та 2-ї використаних пар праймерів) методом зворотнотранскриптно-полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) у лабораторії молекулярної біохімії Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України. Препарат катіонних ліпосом/ДНК виготовлявся за допомогою реактиву DOTAPMethosulfate виробництва SIGMA-ALDRICH (США) у відповідності до інструкції виробника. Використовувалось 5 мкг DOTAPMethosulfate на 1 мкг ДНК. Суміш катіонних ліпосом та ДНК готувалась безпосередньо перед введенням збобтовуванням ДНК з катіонними ліпосомами протягом 10 хвилин.

По закінченню дослідження тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Видалений мозок щурів для морфологічного дослідження занурювали в 10% розчин нейтрального формаліну для фіксації. Отримані зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином. Оцінку мікропрепаратів проводили під мікроскопом МІКМЕД-1 при різних збільшеннях (окуляр x10, об'єктив x4, x10, x20, x40, x100).

РЕЗУЛЬТАТИ

Проведене морфологічне дослідження сенсомоторної зони кори півкулі мозку щурів інтактної групи показало, що до її складу входять нейрони та велика кількість гліальних клітин. У корі спостерігаються шари з переважанням тіл нейронів та шари з переважанням їх аксонів. Більшість площі кори (біля 85%) має класичну 6-ти шарову будову: молекулярний, зовнішній зернистий шар, зовнішній пірамідний шар, внутрішній зернистий та внутрішній пірамідний шари, гангліозний та поліморфний шар, який безпосередньо продовжується у білу мозкову речовину (рис. 1). Найкраще візуалізувалися нейрони (їх тіла та ядра) у III та V шарах, де ми визначали також непошкоджені судинні структури: незмінені базальні мембрани, ендотелій, який суцільно вистилає внутрішню поверхню судин, був однорідним за формою та розмірами. М'яка мозкова оболонка вистилає канали з розташованими кровоносними судинами, артерії та артеріоли в ній були помірно повнокровні, зрідка у їх просвіті зустрічались еритроцити (рис 2).

Якісну оцінку нейроцитів ми проводили, користуючись класифікацією Боголепова. Так, нормохромні нейроцити визначалися по рівномірній базифільно

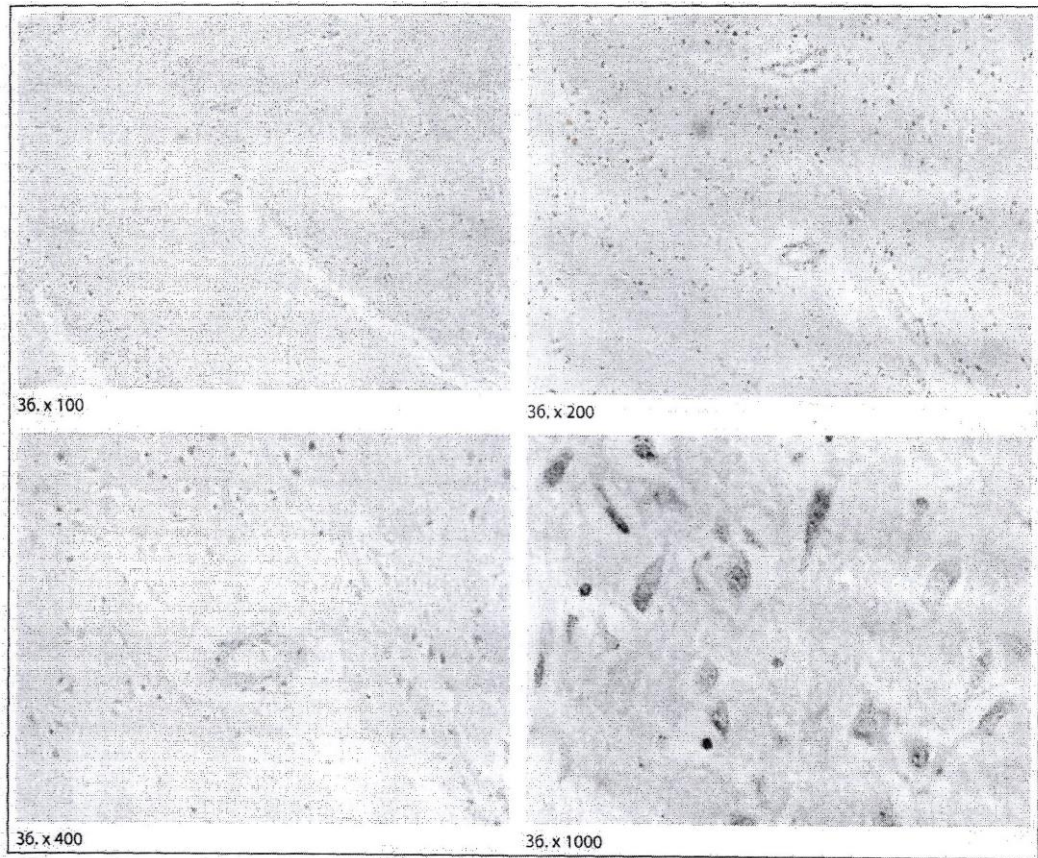


Рис. 3. Стан сенсомоторної зони кори головного мозку при експериментальному атеросклерозі. Забарвлення гематоксилін-еозином.

пофарбованій цитоплазмі, світлим округлим ядрам з ядерцями. У III і V шарах сенсомоторної зони кори головного мозку шурів нормоцитів було до 90%, приблизно порівну (по 5%) спостерігалися гіпохромні нейроти (клітини з дуже світлою цитоплазмою і дуже світлими ядрами) і гіперхромні нейроти (клітини з темною цитоплазмою і темними ядрами). Морфологічне дослідження кори в III і V шарах тварин з експериментальним атеросклерозом показало кількісну і якісну зміну клітинного складу. Так ми спостерігали атрофічно та деструктивно змінені нейрони, перичелюлярний набряк навколо них. Цитоплазма нейронів була гомогенізованою. Спостерігався каріопікноз та каріолізис, часто ядерця не візуалізувались. Периваскулярне розростання тонковолокнистої фіброзної тканини супроводжувалося вираженою гіперплазією гліоцитів, помірною вогнищевою лейкоцитарною інфільтрацією, переважно лімфоцитарного клітинного складу, більше в периваскулярній зоні (рис. 3).

Зменшилася кількість нормохромних клітин (до 50-ти %), гіпохромних клітин (до 4%), в 2 рази збільшилася кількість гіперхромних нейронів (до 10%), спостерігалися також різкогіперхромні нейроти (до 20%) і різкогіпохромні нейроти (до 10 %), без'ядерні клітини визначали за класифікацією Боголепова як клітини-тіні (до 6%). Експериментальний атеросклероз призводив до суттєвого збільшення прошарків нейроглії, збільшення діаметру просвіту судин за рахунок потовщення внутрішнього та середнього шарів, спостерігалась чітка відмежованість базальної мембрани та ендотеліального покриття, поширеним було явище стази та агрегації еритроцитів у просвіті артеріол та венул, набряк та деструкція ендотеліоцитів. Просвіт судин мікроциркуляторного русла був нерівномірний: вогнища повнокров'я чергувались зі звуженням просвітів судин. У стінках артеріол ендотеліоцити були деструктивно змінені, з ознаками дистрофії цитоплазми, значно збільшеними дефектними ділянками. Ендотеліальна

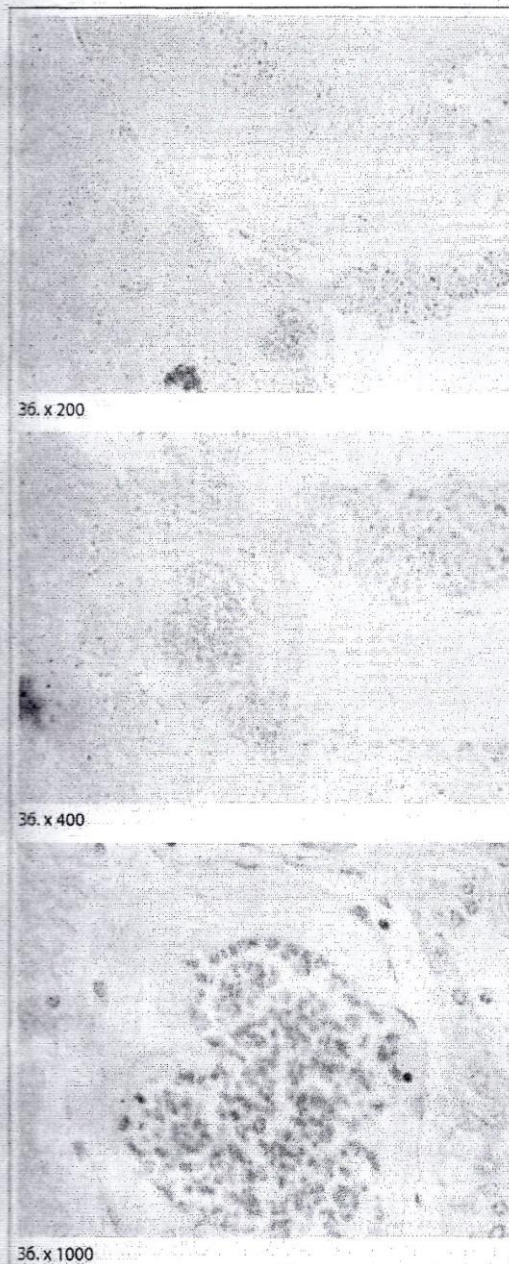


Рис. 4. Стан судин сенсомоторної зони кори головного мозку при експериментальному атеросклерозі. Забарвлення гематоксилін-еозином.

вистилка утворювала несучільну поверхню, були наявними ділянки десквамації і вогнища регенерації ендотеліоцитів. В базальній пластинці спостерігався виражений набряк. В середній оболонці судин,

а саме м'язовому шарі, була виражена гіпертрофія гладком'язової тканини (рис.4). Генна терапія мала виражену нейропротекторну дію, приводила до відновлення кількісного і якісного складу нейронів. Так, у III і V шарах сенсомоторної зони кори головного мозку щурів нормоцитів було до 70%, приблизно порівну (по 10%) спостерігалися гіпохромні нейроцити і гіперхромні нейроцити, кількість річкогіперхромних та різкогіпохромних нейроцитів складала по 5%. Зменшилась кількість атрофічно та деструктивно змінених нейронів, значно меншим або взагалі відсутнім був перичелюлярний набряк навколо них. В поодиноких клітинах спостерігався каріопікноз та каріолізис, але більшість клітин мали добре видимі ядро з ядерцем. В периваскулярній зоні лімфатична інфільтрація майже не спостерігалась, не була помітною також гіперплазія гліоцитів (рис. 5). Генна терапія приводила до суттєвого збільшення діаметру просвіту судин за рахунок зменшення внутрішнього та середнього шарів. Стаз еритроцитів у порівнянні з групою тварин з експериментальним атеросклерозом був незначним (рис. 6).

ОБГОВОРЕННЯ

В нормі під впливом атерогенної дієти та при надлишку холестеролу з їжею в гепатоцитах посилюється синтез білка apoE, на мембранах гепатоцитів збільшується кількість β -ЛП-Р, а також збільшується вміст β -ЛП в плазмі. Цей механізм гальмує синтез холестеролу гепатоцитами [21], та підтримує нормальний рівень ліпідемії. Було доведено, що головна функція гепатоцитів в підтриманні ліпідного гомеостазу полягає в синтезі аполіпів та ЛП, їх рецепторів, а також в регуляції їх метаболічного балансу. В умовах довготривалого холестеролового навантаження, а також під дією інших стресових чинників ці функції гепатоцитів порушуються чи блокуються, чому сприяє порушення функціонального стану клітин макрофагально-моноцитарного ряду в організмі, і перш за все в самій печінці [9, 22]. Як наслідок модифіковані β -ЛП в інтимі судини включають процес атерогенезу, а макрофаги при цьому перетворюються на ліпоїдні пінисті клітини з порушеною функціональною активністю. Модифіковані β -ЛП розпізнаються спеціальними рецепторами, розташованими на поверхні макрофагів, ендотеліоцитів та гепатоцитів, захоплюючись при цьому цими клітинами та включаючись в подальший метаболізм. У мишей, нокаутуваних по гену APOE, при надлишковому холестероловому навантаженні з їжею швидко розвивається важкий атеросклероз. Навпаки, введення рекомбінантного APOE, чи його надекспресія у тварин із змодельованим атеросклерозом, приводить до зниження рівня холестеролу, атерогенних ЛП та регресії атеросклеротичних змін [23]. APOE належить

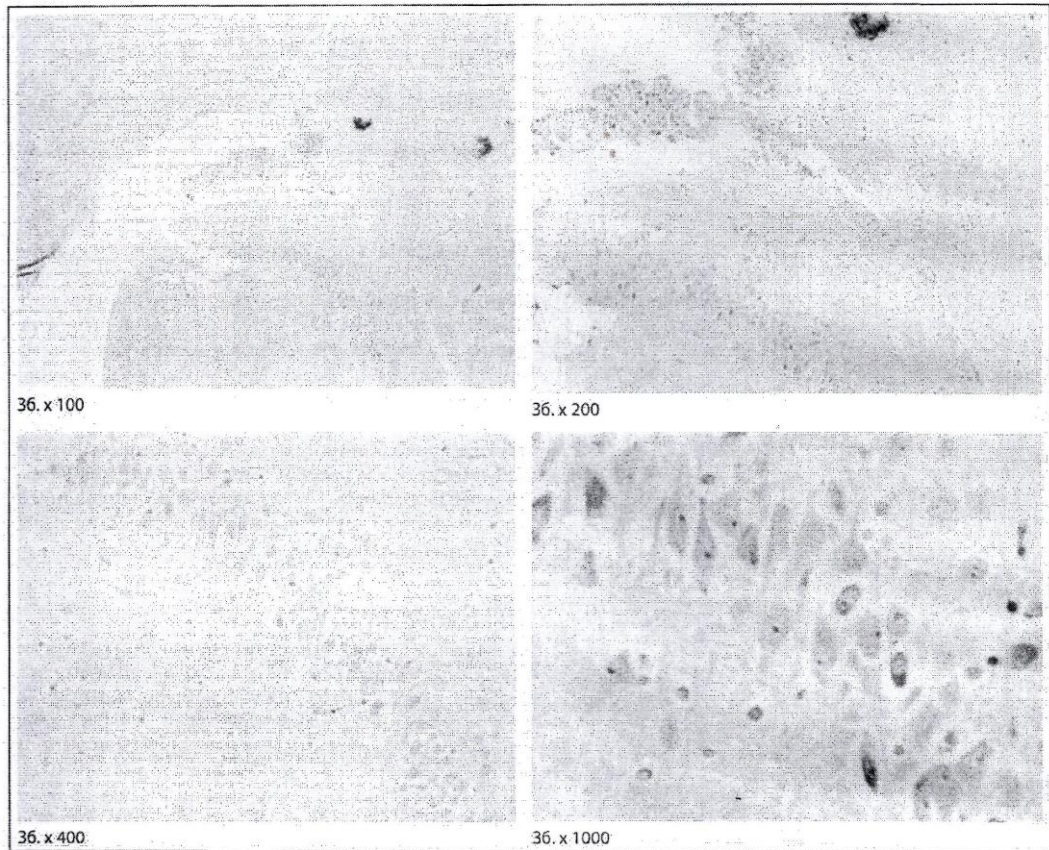


Рис. 5. Стан сенсомоторної зони кори головного мозку при експериментальному атеросклерозі та генній терапії. Забарвлення гематоксилін-еозином.

до тих генів, експресія яких, а, отже, і синтез відповідного білка, активізується у відповідь на механічне і ішемічне пошкодження також і ЦНС [24]. Вважається, що в даному випадку apoE має велике значення для репарації ліпідного компонента мембран глії і нейронів. Розуміння ролі генотипу по APOE в результаті атеросклерозу та його віддалених наслідках (зокрема інсульту) стало передумовою для гіпотези про доцільність використання при даній патології аполипопротеїнов apoE2 і apoE3 як терапевтичних агентів, здатних надати лікувальний вплив [23]. В даний час методи генної та клітинної терапії, спрямовані на індукцію синтезу apoE в організмі, розроблені в експерименті. Оцінка їх ефективності була проведена з використанням APOE нокаутованих мишей [25]. Такі тварини демонструють виражену гіперхолестеролемію і спонтанний розвиток атеросклерозу, будучи, таким чином, чудовою моделлю для розробки методів і оцінки перспектив генної терапії при генетичних

дисліпопротеїнеміях людини [26]. Введення гена APOE in vivo за допомогою плазмідного або аденовірусного вектора [23] APOE-дефіцитним мишам забезпечувала ефективну експресію відповідних мРНК і білка, що сприяло зниженню в крові рівнів загального холестеролу і атерогенних ліпопротеїнів (ЛПДНЩ, ЛППП, ЛПНЩ), а також збільшення концентрації антиатерогенної фракції ЛПВЩ. Нормалізація ліпідного профілю, особливо на ранній стадії атерогенеза, відповідала зменшенню площі ураження судинної стінки. Трансфекція генами APOE2 і APOE3 людини тварин з APOE-дефіцитним генотипом не відрізняється методологічно і надає аналогічний протекторний вплив [23, 27]. В одній з експериментальних робіт [28] показано, що трансгенні ізоформи apoE людини викликають у APOE-дефіцитних мишей зменшення в гіпокампульних протоплазматичних астроцитах числа фібрил-гранулярних включень, що містять амілоїдний пептид.

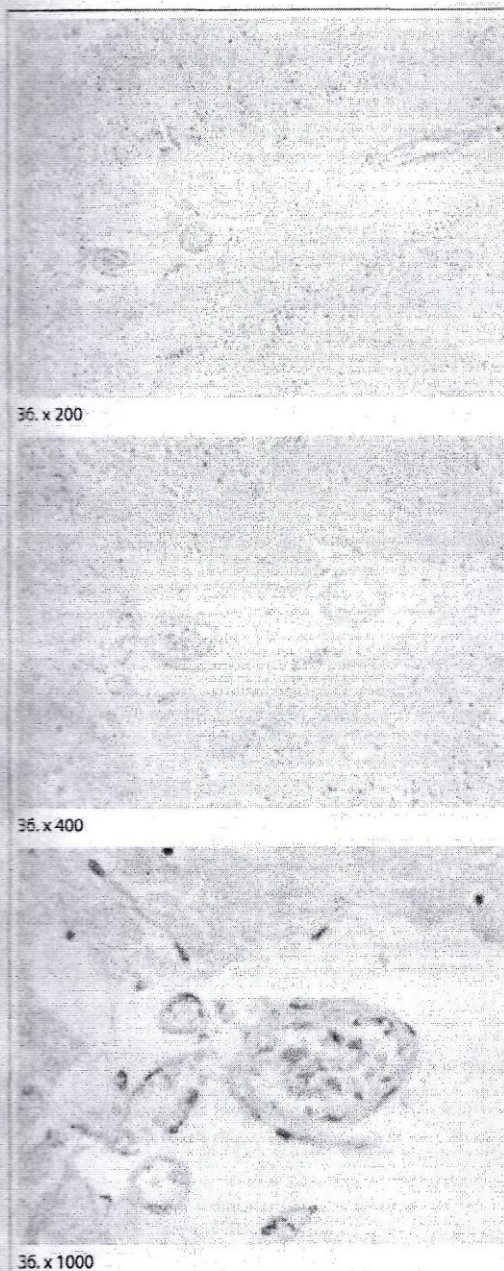


Рис. 6. Стан судин сенсомоторної зони кори головного мозку при експериментальному атеросклерозі та генній терапії. Забарвлення гематоксилін-еозином.

Отримані нами результати морфологічного дослідження тканини мозку щурів при експериментальному атеросклерозі та його генній профілактиці трансфекції

гену APOE та наведені літературні дані доводять виключно важливу роль білка apoE в нормальному функціонуванні ЦНС, а також необхідність цього протеїна для репарації нервової тканини при її пошкодженнях і тому числі і атеросклеротичним процесом.

ВИСНОВКИ

Експериментальне холестеролове навантаження призводить до вираженої дистрофії сенсомоторного шару кори головного мозку щурів. Отримані дані свідчать про позитивну профілактичну дію генної трансфекції на якісний та кількісний клітинний склад та стан судинного русла кори головного мозку експериментальних тварин та потребують подальшого перспективного дослідження.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amosova EN. Ot lecheniya ateroskleroza k modyfykatsyy prognoza: fokus na lypidosnyzhaiushchuyu terapiyu [From the treatment of atherosclerosis to the modification of the prognosis: focus on lipid-lowering therapy]. P.1. Sertse i sudyny. 2011;1:6-19.
2. Pyskun RP, Beloshytskaia AV, Mryh NM et al. Harakteristika funktsionalnoy morfologii serdtsa, legkih, pecheni i pochk v kompensatorno-prisposobitelnykh protsesakh pri eksperimentalnom ateroskleroze [Characteristics of functional morphology of the heart, lungs, liver and kidneys in compensatory-adaptive processes in experimental atherosclerosis]. Visnyk morfolohii. 2010;16(1):159-162.
3. Piskun Raisa, Biloshicka Alina, Istosyn Valerij. Characteristics of lipid spectrum of blood serum in experimental atherosclerosis and in gene therapy. Annales universitatis Mariae Curie-Skłodowska. 2008; XXXII(1, 34): 207-208.
4. Pedachenko EG, Biloshytsky VV, Mikhaľsky SA, Gridina NY, Kvintitskaya-Ryzhova TY. Vliyanie gennoy terapii genom APOE3 na strukturnyye i funktsionalnyie proyavleniya vtorichnykh povrezhdeniy gippokampa pri eksperimentalnoy travmaticheskoy cherepno-mozgovoy travme [The effect of gene therapy with the APOE3 Gene on structural and functional manifestations of secondary hippocampal damages in experimental traumatic brain injury]. Zh Vopr Neirokhir Im N N Burdenko. 2015;79(2):21-32. doi: 10.17116/neiro201579221-32. Russian. PubMed PMID: 26146041.
5. Biloshytska AV, Piskun RP, Istosyn VM. Funktsionalni zminy pechinky pry eksperymentalnomu aterosklerozi ta yoho hennii korektsii [Functional changes of the liver in experimental atherosclerosis and its genetic correction] Klinichna ta eksperymentalna farmakolohiia. VI Vseukrainska naukovo-praktychna konferentsiia z mizhnarodnoiu uchastiu z klinichnoi farmakolohii, prysviachena 90-richchiu profesora O.O. Stoliarchuka. 2010: 157-160.
6. Dolzhenko MN. Korrektsiya povysheniya transaminaz pecheni pri provedenii gipolipidemicheskoy terapii: fokus na kombinatsiyu statinov i UDHK [Correction of an increase in liver transaminases during lipid-lowering therapy: a focus on a combination of statins and UDCA]. Liky Ukrainy. 2008;7:95-98.
7. Dolzhenko MN. Osobennosti gipolipidemicheskoy terapii u bolnykh ishemicheskoy boleznью serdtsa v sochetanii s nealkogolnyim steatohepatitom [Features of lipid-lowering therapy in patients with ischemic heart disease in combination with non-alcoholic steatohepatitis]. Suchasna gastroenterolohiia. 2010;2(52): 65-69.

8. Tuszynski MH, Gage FH. Maintaining the neuronal phenotype after injury in the adult CNS. Neurotrophic factors, axonal substrates and gene therapy. Mol. Neurobiol. 1995;10:151-167.
9. Biloshitska AV. Vplyv transfektsii henu apoE na strukturu hepatotsytiv pry eksperymentalnomu aterosklerozi [Influence of transfection of apoE gene on the structure of hepatocytes in experimental atherosclerosis]. Journal of Clinical and Experimental Medical Researches. 2017;5(1): 703-712.
10. Crystal RG. Transfer of genes to humans: Early lessons and obstacles to success. Science. 1995;270:404-410.
11. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science. 1988;240(4852):622-630.
12. Hui DY, Brecht WJ, Hall EA et al. Isolation and characterization of the apolipoprotein E receptor from canine and human liver. J.Biol.Chem. 1986;V.261(9): 4256-4267.
13. Teusink B, Mensenkamp AR, van der Boom H. et al. Stimulation of the in vivo production of very low density lipoproteins by apolipoprotein E is independent of the presence of the low density lipoprotein receptor. J.Biol.Chem. 2001;276(44): 40693-40697.
14. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH et al. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. J.Biol.Chem. 1987;262(29): 14352-14360.
15. Iron A, Richard P, Beudier I et al. Pathology of the human apolipoprotein E gene. Bull.Acad.Natl.Med. 1994;173(3): 415-426.
16. Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. Curr.Opin.Lipidol. 1999;10(3): 207-217.
17. Mahley RW, Rall SC Jr. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill Inc; 2001.
18. Rexin M, Feussner G. A competitive reverse transcription-PCR to study apolipoprotein E gene expression. Clin.Chem. 1998;44:773-778.
19. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B et al. Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoproteins E genotype. J.Lipid Res. 2000;41:1812-1822.
20. Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure-functional relationships. Adv.Protein.Chem. 1994; 45:249-302.
21. Yvashkyn VI. Diseases of the liver and bile ducts. M.:Vesti;2002.
22. Shlykova OA, Kutsenko LA, Baranova AF. Izuchenie polimorfizma genov obmena holesterina u patsientov s dislipidemiyei [Study of polymorphism of cholesterol exchange genes in patients with dyslipidemia]. Materialy IV z'їzdu medychnykh henetykiv Ukrainy, 2008 9-11 zhovtnja, Lviv, Ukraine, 2008, 106.
23. Athanasiopolus T, Owen JS, Hassall D et al. Intramuscular injection of a plasmid-vector expressing human apolipoprotein E limits progression of xanthoma and aortic atheroma in apo-E deficient mice. Human Molecular Genetics. 2000;9(17):2545-2551.
24. Smith C, Graham DJ, Nikill JA et al. Effect of apolipoprotein E genotype on hematoma volume after trauma. J. Neurosurg. 2002;96(1):90-96.
25. George J, Afek A, Keren P. Functional inhibition of Rasby S- trans, trans-Farnesyl Thiosalicylic Acid Attenuates Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. Circulation. 2002;105:2416-2422.
26. Zeller N. ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of Aβ. Neuron. 2008;1:681-693.
27. Verma IM. Gene therapy: twenty-first century medicine. Annual Rev. Biochemistry. 2005;74:415-435.
28. Nicoll JA, Roberts GW, Graham DJ. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head injury. Nat. Med. 1995;1(2):151-152.

Дослідження виконано відповідно до плану Інституту нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова АМН України «Дослідження молекулярногенетичних змін при черепно-мозковій травмі та можливості генної терапії», № держреєстрації 0102U003249 та ВНМУ ім. М.І.Пирогова «Морфобіологічний стан кровоносного русла та клітинних елементів органів і тканин при експериментальному аterosklerozi в умовах генної терапії», № держреєстрації 0108U001484.