

## ОБЗОР

УДК 615.277.3.015.44

©Коллектив авторов

### АПОПТОЗ ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ СПИННОГО МОЗГА: ПЕРСПЕКТИВЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

А.Г. БАСНАКЬЯН<sup>1</sup>, А.В. БАСКОВ<sup>2</sup>, Н.Н. СОКОЛОВ<sup>3</sup>, И.А. БОРЩЕНКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Arkansas for Medical Sciences 4301 West Markham, Slot 501 Little Rock, Arkansas 72211 USA

Телефон/факс (501) 257-4833/257-5827;

эл. почта: basnakianalexeig@exchange.uams.edu

<sup>2</sup>НИИ нейрохирургии им. Н.Н.Бурденко, 125047 Москва, ул. Фадеева, 5

Телефон/факс (095) 251-65-26/975-22-28; эл. почта: abaskov@mail.ru

<sup>3</sup>НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119832 Москва,

Погодинская ул., 10; Телефон/факс (095) 246-33-80/ 245-08-57;

эл. почта: sokolov@medic.ibmh.msk.su

Травма спинного мозга является серьезной проблемой современной медицины. Морфологические исследования указывают на присутствие двух альтернативных путей гибели клеток травмированного спинного мозга: непосредственного некротического повреждения и отсроченной апоптозной гибели клеток. При этом апоптоз продолжается до 14 дней после травмы и затрагивает нейроны и глию на значительном удалении от травматического очага. В обзоре рассмотрены основные стадии апоптоза спинного мозга, биохимическая регуляция этого процесса и методы его детекции. Тот факт, что апоптоз является физиологическим механизмом клеточной гибели и имеет обратимые этапы позволяет рассматривать вопрос о возможной фармакологической коррекции апоптоза. Особое внимание уделено антиапоптозной терапии с использованием антисмысловых олигодезоксинуклеотидов и перспективам генной терапии.

**Ключевые слова:** апоптоз, травма спинного мозга, антиапоптозная терапия, генная терапия, антисмысловые олигодезоксинуклеотиды

**ВВЕДЕНИЕ.** Травматическое повреждение спинного мозга является одной из актуальных проблем нейробиологии и нейрохирургии, поскольку такая травма, помимо страданий больного, сопряжена с серьезными социальными и экономическими последствиями. Исследования последних десятилетий вселяют надежду на то, что в арсенале врача могут появиться методы лечения, которые позволят уменьшить медицинский и социальный ущерб, вызванный травмой спинного мозга. Морфологическое изучение травмированного спинного мозга указывает на то, что разрушение ткани не ограничивается областью воздействия разрушающей силы, а продолжается во времени, захватывая первично интактные участки мозга, и приводя к образованию большего очага повреждения, чем начальная травма. Другими словами, суммарное число погибших клеток спинного мозга значительно превышает количество разрушенных в момент травмы. Современная концепция патогенеза травматического повреждения спинного мозга рассматривает два основных взаимосвязанных механизма гибели клеток: апоптоз и некроз. Понимание этих процессов исторически происходило не одновременно. Начиная с работ Вирхова (1859 г.), было проведено детальное морфологическое описание смерти клетки, названной некрозом, под которым понимали необратимые изменения тканей [1]. По мере развития гистологических методов окраски, позволивших описывать детали процесса умирания стало ясно, что некроз представляет собой не одномоментный, а растянутый во времени процесс. В 1895 г. Флеммингом был описан хроматолиз - процесс быстрого исчезновения образовавшихся при распаде клеток фрагментов ядра [2]. Позднее Вейгерт ввел термины аутолиз, пикноз и кариолизис [3]. Со временем стали появляться гипотезы о существовании естественного механизма смерти клеток, позволяющего поддерживать клеточную популяцию в количественном и качественном составе на определенном уровне. В 1950 г. Глуксман детально описал клеточную смерть у эмбрионов [4]. Но только в 70-х годах, в работах Керра было впервые введено понятие апоптозной клеточной смерти в противоположность некротической [5].

Морфологическое изучение поврежденного спинного мозга и поиск путей его восстановления вскоре выявили, что оба типа клеточной смерти имеют место и в травмированном спинном мозге. В настоящее время апоптоз рассматривается как наиболее распространенный тип клеточной смерти и как один из важнейших путей клеточного обмена при травме. В предлагаемом читателю обзоре мы попытаемся очертить круг наиболее существенных проблем, связанных с апоптозом в спинном мозге при травме и возможные пути их решения.

**Клеточная гибель при травме спинного мозга.** С некрозом связывают первичное непосредственное повреждение мозговой ткани в момент приложения травматической силы - контузия паренхимы мозга, ее сдавление, а также дисциркуляторные расстройства вследствие поражения сосудов. Основным морфологическим проявлением первичного повреждения является некротический очаг, который включает в себя обломки разрушенных клеток и клетки, участвующие в развитии воспаления, неизменно развивающегося в результате некроза. Некротический очаг впоследствии эволюционирует в глиально-соединительно-тканый рубец, вблизи которого в дистальном и проксимальном отделах спинного

мозга образуется область кавитации. Мелкие полости могут сливаться с образованием посттравматических кист различного размера. Таким образом, некроз характеризуется гибелью клеток в результате внешнего чрезмерного повреждающего воздействия, что приводит к нарушению их энергообеспечения, разрушению клеточных мембран, набуханию и распаду клетки. Микроскопический портрет клетки в состоянии некроза очень характерен. На ранних этапах некроза наблюдается конденсация хроматина в не резко очерченные массы и деградация цитоплазматических структур, позже происходит разрушение мембран и дезинтеграция клетки.

Наряду с некрозом, в момент травмы запускается механизм отсроченного (вторичного) повреждения клеток, в основе которого лежит апоптоз [6-8], представляющий собой физиологическую гибель клеток, необходимую для обновления клеточного пула органов, дифференцировки и развития тканей [9]. Помимо этого, апоптоз активируется и тем самым предохраняет ткани от возможных последствий при сублетальных повреждениях, недостаточных для прямого уничтожения клетки путем некроза [10]. При таком слабом повреждении селективное уничтожение одной или нескольких клеток, несомненно, способствует оздоровлению органа. Однако если слабое повреждение охватывает значительную зону органа (например, при его контузии или гипоксии), то апоптоз превосходит по своей силе репарационный потенциал ткани и фактически убивает поврежденную зону или весь орган. Многочисленные исследования последних лет показали, что часто именно апоптоз, а не некроз, лежит в основе инфаркта миокарда, острой почечной недостаточности, инсульта, травмы головного мозга и других заболеваний, связанных с высокой смертностью; апоптоз обычно развивается при действии менее сильного повреждающего фактора, который запускает внутренние энергозависимые механизмы самоуничтожения клетки [10-14]. При микроскопическом исследовании таких клеток наблюдается конденсация ядерного хроматина, сморщивание тела клетки при сохранной цитоплазматической мембране. Затем происходит разделение на отдельные фрагменты цитоплазмы - так называемые апоптозные тельца, содержащие фрагменты хроматина и органеллы клетки. Элиминацию апоптозных тел осуществляют макрофаги. В отличие от некроза, который сопровождается воспалением, при апоптозе отсутствует лейкоцитарная инфильтрация. Таковы некоторые морфологические отличия клеток в состоянии апоптоза и некроза. Возможность перехода апоптоза в некроз (апоптозно-некротический континуум, апонекроз) недостаточно изучена, и это является предметом более широкого рассмотрения проблемы.

Выявлены виды клеток, подверженных апоптозу в спинном мозге и пространственно - временное распространение этого процесса [15]. В первые часы после травмы апоптоз наблюдается вблизи от некротического очага - это апоптоз нейронов (пик гибели - 4-8 часов), микроглии, олигодендроглии (пик гибели - на третьи сутки). Второй пик апоптоза - 7 - 14 суток после травмы сопровождается гибелью олигодендроцитов, причем волна апоптоза распространяется на отдалении от первичного места травмы [16-18]. Апоптоз нейронов приводит к увеличению потерь активных нейронов, а апоптоз глиальных клеток - к распространенной восходящей и нисходящей дегенерации [7,19,20]. Интересно, что олигодендроциты

фактически попадают в ловушки между дегенерированными нервными волокнами. Предполагают, что подобная изоляция клеток глии приводит к еще большему распространению апоптоза и дегенерации [19]. В результате этого локальное повреждение приводит к распространенной дисфункции больших отрезков спинного мозга [6,11,15,21,22]. Таким образом, апоптоз запускается непосредственно в момент травмы, продолжается на протяжении длительного времени после первичного повреждения, и распространяется на значительные расстояния от некротического контузионного очага вдоль спинного мозга. Проявлением этого процесса является дегенерация нервных волокон на значительном протяжении нервной системы [11].

**Регуляция апоптоза в поврежденном спинном мозге.** Изучение апоптоза при травматическом повреждении спинного мозга является очень перспективным с точки зрения возможности влияния на патологический процесс. В то время как некроз представляет собой необратимую гибель клетки, смерть в результате апоптоза на определенных этапах может быть задержана или предупреждена. Поэтому во многих лабораториях мира проводятся исследования с целью изучения механизмов активации апоптоза, его временного и пространственного распространения в клеточной популяции ткани. Выясняются индукторы, супрессоры и исполнители программы апоптоза, а так же возможные пути влияния на этот процесс, и, прежде всего его торможения, с целью повышения выживаемости клеток

Причиной развития апоптоза может быть прямое воздействие на геном клетки (вирусы) или не прямое влияние через нейромедиаторы (глутамат), медиаторы воспаления, ишемию и т.д. Такая полиэтиологичность апоптоза связывает его со многими патологическими состояниями, такими как травма, ишемия, инфекции. В неповрежденной клетке процесс апоптоза находится под строгим генетическим контролем. Это связано с тем, что запрограммированная клеточная гибель является необходимым процессом клеточной замены в эмбриогенезе, а у взрослой особи - механизмом естественной элиминации клеток. На генетическом уровне изменения, сопровождающие апоптоз, проявляются экспрессией особых генов и трансляцией соответствующих белков. Такие агенты как  $Ca^{2+}$ , глутамат, ишемия, гипоксия запускают включение генов, инициирующих развитие апоптоза.

Известно, по крайней мере, несколько генов, ответственных за развитие апоптоза в спинном мозге. Среди них есть как индукторы - *Fas/apo-1*, *p53* [23,24], так и ингибиторы апоптоза - *bcl-2*, *bcl-x*, *bax* [25,26]. Наиболее изученными являются гены раннего немедленного ответа и соответствующие им белки. В частности это белок *p53*, известный как регулятор клеточного цикла и супрессор опухолей, который участвует в восстановлении ДНК поврежденной клетки [24]. Максимум его содержания определяется через двое суток, к седьмым суткам посттравматического периода этот белок исчезает. Обнаруживается *p53* в глиальных клетках и на некотором удалении от места травмы спинного мозга, и это является ранним ответом, предшествующим валлеровской дегенерации волокон [27,28]. Таким образом, апоптоз нейронов приводит к прогрессирующей потере числа активных клеток, а апоптоз глии препятствует выживанию и прорастанию оставшихся волокон, что выражается в отсутствии полноценной регенерации в спинном мозге.

Как и во многих других тканях, апоптоз в спинном мозге представляет собой многостадийный процесс. В первых исследованиях, позволивших идентифицировать



апоптоз как новый вид клеточной смерти, были выделены две его стадии [5,29]. Начальная, обратимая фаза апоптоза запускает предполагаемую генетическую программу клеточной гибели и заканчивается активацией эндонуклеаз, ответственных за фрагментацию ДНК. После того, как эндонуклеазы активированы и началось дробление ДНК, апоптоз переходит во вторую фазу, необратимую, которая заканчивается появлением морфологических признаков апоптоза, дезинтеграции клетки и ее ассимиляции макрофагами. Исследования последних лет позволили выявить многочисленную группу (каскад) цистеиновых протеаз - каспаз, которые активируя друг друга, во многих случаях составляют основу реализации программы клеточной гибели [30,31]. С появлением каспаз была выделена третья, промежуточная фаза апоптоза, связанная с активацией так называемых исполнителей апоптоза, к которым отнесены нижние каспазы (downstream caspases) и эндонуклеазы [30,32]. Считают, что эта промежуточная фаза до начала фрагментации ДНК также является обратимой.

Активация исполнителей апоптоза представляет собой результат разветвленной цепи биохимических реакций, смысл которых в конечном итоге состоит в том, чтобы практический любой внешний повреждающий сигнал мог приводить к фрагментации ДНК и клеточной смерти. Внешний агент - гормон, нейротрансмиттер, цитокин и др. вызывают возрастание внутриклеточного содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Этот ион, являющийся вторичным мессенджером, поступает в цитоплазму по открывающимся каналам из внешнего пространства и из внутриклеточных депо - митохондрий, эндоплазматической сети. Активный комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин взаимодействует с протеинкиназами, которые активируют исполнители апоптоза, и в первую очередь нижние каспазы [33].

Наиболее изученным представителем нижних каспаз в спинном мозге является каспаза 3, которая активируется при травматическом повреждении спинного мозга. [8,34]. Субстратом для этой каспазы служит множество белков цитоскелета (ламинин, G-актин, фодрин, пресенилин), ферменты репарации ДНК и регуляторы клеточного цикла (PARP, pRb), протеинкиназы (MEKK 1, FAK, PAK 2) - так называемые «субстраты смерти» [30]. По крайней мере, некоторые из этих белков являются внутриклеточными ингибиторами эндонуклеаз. Например G-актин ингибирует ДНКазу I, а PARP -  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимую эндонуклеазу [35,36]. Кроме того, каспаза 3 расщепляет специфический ингибитор каспазо-активируемой ДНКазы - CAD [37]. В результате CAD высвобождается из комплекса с ингибитором и фрагментирует ДНК клетки. Кроме CAD, в спинном мозгу, как и в других тканях, присутствуют, по крайней мере, еще 3 эндонуклеазы, которые обычно ассоциируются с апоптозом: ДНКазы I, ДНКазы II и  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза [37-40]. Есть основания полагать, что  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза и ДНКазы I являются на самом деле одним и тем же ферментом [41]. Особенностью нервной ткани является то, что по сравнению с другими тканями активность эндонуклеаз в ней крайне низка [42-44]. Хотя это и представляет некоторую техническую трудность при определении фрагментации ДНК, количество разрывов в ДНК, необходимое для инициации необратимой клеточной смерти, также невелико. Считается, что 40 двуцепочечных разрывов ДНК на клетку, т.е. примерно один разрыв на хромосому, является летальным [45].

**Методы выявления апоптоза в ткани спинного мозга.** Современные методы позволяют выявить самые ранние стадии апоптоза в клетках травмированного спинного мозга. При этом механизм травмы не имеет значения – апоптоз при сдавлении и ушибе мозга в эксперименте (drop-weight model) или его пересечении одинаково хорошо детектируются. Наиболее широко используются методы, направленные на выявление фрагментации ДНК при апоптозе [17,21,46]. Часто используемый и простой метод определения межнуклеосомной фрагментации ДНК хроматина с образованием лестницы фрагментов в агарозном геле, кратных 200 парам нуклеотидов (200 bp ladder), позволяет выявить апоптоз в ткани не более чем за 2 часа работы [11,21]. Недостатком этого метода является его низкая чувствительность, так как он показывает конечный этап деградации хромосомной ДНК. В тканях спинного мозга с низкой активностью эндонуклеаз такая межнуклеосомальная фрагментация ДНК может быть выявлена на много часов или даже дней позднее реальной фрагментации ДНК, приведшей к клеточной смерти. Так как дробление ДНК не прекращается после начала апоптоза, некоторые авторы приходят к выводу, что разрывы ДНК – это позднее событие, происходящее после смерти клетки [47].

Гораздо более чувствительным является электрофорез в пульсирующем поле (pulse-field electrophoresis). С помощью этого метода фрагменты ДНК размером 50 и 300 тысяч пар оснований (петли хроматина), которые связывают с апоптозной фрагментацией ДНК, могут быть выявлены на ранних этапах клеточной смерти [48]. Однако, даже этот метод не позволяет обнаружить начальную фрагментацию ДНК хроматина, при которой первичные фрагменты должны быть в несколько десятков раз длиннее (порядка нескольких миллиметров длиной!). Видимо, разработка такого метода является делом будущих исследований. Из методов определения редких разрывов в ДНК, которые могут найти применение для анализа фрагментации ДНК при спинномозговой травме, необходимо назвать метод ROPS (Random Oligonucleotide-Primed Synthesis) [36,43,49,50]. Этот высокочувствительный и количественный метод основан на радиоизотопном мечении концов ДНК, образованных эндонуклеазами [49,50]. С помощью метода ROPS удалось определить и измерить фрагментацию ДНК на начальных этапах апоптоза вследствие травмы головного мозга у крысы [43].

Ткань спинного мозга гетерогенна по клеточному составу, и отдельные популяции клеток или даже отдельные клетки могут иметь повышенную чувствительность к факторам, вызывающим апоптоз. При этом, методы, основанные на анализе фрагментации ДНК в индивидуальных клетках в срезах ткани, приобретают особое значение. Среди таких *in situ* подходов необходимо назвать методы TUNEL (TRANSFERASE-MEDIATED dUTP NICK END LABELING) и ISEL (IN SITU END LABELING) [51,52]. Данные подходы позволяют выявить изменения ДНК на самых ранних стадиях апоптоза, до того, как появятся тельца апоптоза – фрагментированная ДНК в виде глыбок хроматина в ядре или в цитоплазматических каплях вне клетки [53]. Метод TUNEL, получивший наиболее широкое распространение, позволяет регистрировать фрагментацию ДНК спинного мозга в промежутке времени от 4 часов до 7 дней после травмы [17,21]. Все вышеперечисленные методы (ROPS, TUNEL и ISEL) основаны на выявлении 3'-ОН

концов ДНК, которые появляются не только при апоптозе, но так же при репарации ДНК, ее репликативном синтезе и на поздних стадиях некроза [50,54]. Поэтому одновременное использование нескольких методов, включая морфологические исследования для анализа апоптоза в ткани спинного мозга весьма целесообразно.

Кроме фрагментации ДНК, активация или индукция каспаз также является достаточно надежным признаком апоптоза. Использование иммуногистологического метода с применением антикаспазных антител позволяет регистрировать эти протеиназы на ранних этапах посттравматического апоптоза в спинном мозге [8,34]. Некоторые исследователи, однако, отмечают слабую экспрессию каспазы 3 в спинном мозге [55]. Несмотря на успехи биохимической диагностики апоптоза в спинном мозге и других тканях, приходится помнить, что апоптоз и некроз это морфологические понятия [5,29]. Поэтому дифференциальный диагноз апоптоза и некроза не может быть поставлен без учета морфологических критериев, определяемых с помощью световой, электронной или флуоресцентной микроскопии. Маркерами апоптоза является вспенивание (blebbing) цитоплазматической мембраны, усыхание клеток, конденсация хроматина и появление апоптозных тел. Визуализация конденсации хроматина спинного мозга осуществляется с помощью окраски Hoechst 33342 [8]. Некроз обычно ассоциируется с разрушением мембран, набуханием клеток и их лизосом. Так как апоптоз связан с элиминацией отдельных клеток на фоне в целом неповрежденной ткани и погибшие клетки быстро подвергаются фагоцитозу, он часто опознается как кратковременное событие, в то время как некроз, связанный с более массивным поражением ткани, имеет большее время репрезентации. Поэтому прямой подсчет апоптозных и некротических клеток в срезах ткани может давать заниженные цифры апоптоза.

**Возможности влияния на апоптоз в поврежденном спинном мозге и перспективы исследований.** Суммарный эффект травмы можно оценить как сумму первичной гибели нервной ткани и вторичного распространенного повреждения - апоптоза вблизи места травмы и на отдалении. При этом, сохраненные аксоны вследствие демиелинизации теряют нормальную проводимость. В сочетании с низким регенераторным потенциалом нервной ткани такое повреждение приводит к стойкому неврологическому дефициту. Таким образом, можно выделить два основных взаимосвязанных направления воздействия на патологический процесс при травматическом повреждении спинного мозга. Первое - это предотвращение вторичного повреждения нервной ткани путем влияния на апоптоз, и второе - стимуляция регенераторных способностей. Ингибирование апоптоза может способствовать регенерации, а ее стимуляция в свою очередь может подавлять вторичное повреждение [56].

Разработка терапевтического воздействия на апоптоз в настоящий момент находится на начальном этапе. При оценке возможности коррекции апоптоза, вызванного травмой спинного мозга, необходимо, прежде всего, ответить на вопрос: достаточно ли обоснована необходимость ингибирования апоптоза, и каковыми представляются вероятные последствия такого вмешательства? Существенным аргументом в пользу антиапоптозной терапии при спинальной травме является ограниченность регенераторного потенциала спинного мозга. Поэтому такое вмешательство будет проводиться по жизненным показаниям для спинного мозга,



несмотря на риск возможных последствий в виде возникновения неполноценных клеток. Возникает и второй вопрос: на каком этапе апоптоз может быть эффективно ингибирован? На всех обратимых этапах, и чем раньше, тем лучше, при условии, что механизм апоптоза при данной травме известен. Мы будем заинтересованы предотвратить апоптоз как можно раньше, на этапах, когда исполнители апоптоза еще не задействованы. Если конкретный механизм неизвестен, мы будем вынуждены воздействовать на исполнители - как на универсальный этап. Чтобы уменьшить риск, связанный с переходом в необратимую фазу или с появлением каких-то неполноценных клеток, подавление апоптоза в этом случае должно быть произведено в кратчайшие сроки после травмы.

Уже сейчас появляются возможности воздействия на различные этапы механизма развития апоптоза. Значительная роль придается токсическим эффектам «возбуждающих» аминокислот, и среди них - глутамату. Нейротоксичность этих медиаторов реализуется через рецепторы типа NMDA и AMPA, поэтому особое внимание уделяется изучению блокаторов этих рецепторов - МК801, циклогексимида и декстрофана [57,58]. При этом оценивается как выраженность апоптоза, сохранность нервной ткани, так и клинический эффект [58].

Знание временной характеристики развития апоптоза позволяет прогнозировать и планировать лечебную тактику: в частности отсроченная гибель олигодендроцитов дает терапевтическое окно для проведения фармакологической коррекции вторичного повреждения. Среди факторов, которые исследуются в связи с влиянием на апоптоз, можно перечислить следующие:

- введение ганглиозида GM<sub>1</sub> или метилпреднизолон [59]. Выяснено, что метилпреднизолон, который уже используется в схемах лечения острой травмы позвоночника и спинного мозга, подавляет апоптоз на отдалении от очага травмы, но стимулирует его в области травмы;
- исследование влияние ингибиторов каспаз и других протеаз на апоптоз;
- изучение связи апоптоза с медиаторами воспаления - введение интерлейкина 10 [60,61];
- использование простагландина E [62];
- введение рилузола - блокатора глутаматергической нейротоксичности и протеолиза цитоскелета [63];
- исследование влияние факторов роста нервной ткани на апоптоз: NGF, BDNF, NT3 и др.

Значительные успехи в понимании основных патогенетических механизмов развития травматического повреждения спинного мозга дают надежды на обнаружение основных молекулярных мишеней для воздействия на поврежденный спинной мозг. В частности, исследования возможности влияния на экспрессию генов, связанных с апоптозом, например, анти-апоптозного протоонкогена *bcl-x* и *p53* [23,25,46]. Подавление экспрессии проапоптозных генов, с использованием антисмысловых олигонуклеотидов (antisense oligodeoxynucleotides - АСОДН), представляет новую стратегию в разработке методов лечения поврежденного спинного мозга [64]. АСОДН, комплементарные короткому сегменту нуклеотидной последовательности специфической мРНК, обеспечивают ингибирование трансляции мРНК в белок двумя возможными механизмами [65-67].



Первый – это образование двуцепочечной гибридной молекулы АСОДН с мРНК (дуплекс), что превращает молекулу мРНК в субстрат для расщепления рибонуклеазой H [66,67]. При втором механизме АСОДН взаимодействует с областью начальной трансляции мРНК и, образуя там стабильную структуру, тормозит рибосомальную трансляцию [66,67]. АСОДН может также направляться к специфическому участку ядерной ДНК и образовывать трехцепочечную структуру (триплекс). При соединении с областью промотора специфического гена это может также вызвать торможение синтеза специфической мРНК [65]. Для ингибирования апоптоза в ткани поврежденного спинного мозга наиболее вероятной мишенью для терапии АСОДН могут быть каспазы, в частности каспаза 3 или активирующие ее каспаза 6 и каспаза 9, а также эндонуклеазы [34].

Уже сейчас в лаборатории можно синтезировать необходимые последовательности АСОДН для экспериментального лечения больных. Среди проблем данной терапии необходимо назвать нестойкость последовательностей АСОДН – в крови и клетках тканей они подвергаются быстрой деградации нуклеазами. Для стабилизации этих соединений используют их химическую модификацию [64]. Другой проблемой является доставка олигонуклеотидов в клетку. Обладая большим анионным потенциалом эти молекулы с трудом проходят сквозь клеточные мембраны и, в частности, гематоэнцефалический барьер. С целью повышения проникновения АСОДН в ткани исследуются методики непосредственного интрапаренхиматозного введения [64]. В случае с поврежденным спинным мозгом возможно будет достаточно вводить АСОДН в ликвор, поскольку сама травма повреждает гематоспинномозговой барьер, и это облегчит проникновение АСОДН к клеткам.

Другим интригующим подходом к антиапоптозному лечению травматического повреждения спинного мозга является генная терапия. Специально конструируются векторные плазмиды или вирусы, способные направленно заражать клетки спинного мозга и экспрессировать в них заданную мРНК (антисенс) или белок (например, ингибитор апоптоза) [69]. Экспрессированный белок или АСОДН, кодированные такой плазмидой, не только не подвержены быстрой деградации, а, наоборот, постоянно продуцируются клеткой-хозяином в спинном мозге. Разрабатываемые в настоящее время векторные плазмиды и вирусы легко проникают через гематоэнцефалический барьер и не токсичны [68,69]. Важно также, что они не нарушают нормальную функцию нервной системы [70]. Хотя такие исследования пока находятся в стадии разработки с использованием лабораторных животных, успехи генной терапии чрезвычайно обнадеживающие. Среди проблем, с которыми приходится сталкиваться ученым, можно назвать необходимость увеличения специфичности доставки вектора к спинному мозгу и предотвращение нежелательного иммунного ответа на новосинтезированный белок [71].

Несомненно, механизмы апоптоза а также возможные влияния на него при травматическом повреждении спинного мозга будут исследоваться и в дальнейшем. Продолжится поиск фармакологических препаратов, предотвращающих развитие апоптоза. Будут изучаться влияния трансплантационных методик на регенерацию нервной ткани и развитие апоптоза, в том числе пересадка эмбриональной ткани, введение синтетических материалов: Neurogel<sup>TM</sup>, полиэтиленгликоль (сурфактант) и

др. [72,73]. Будет изучаться влияние пассивных движений парализованных конечностей (enreached environment) на процесс регенерации и апоптоз [74]. Эти исследования позволят выработать комплексную терапевтическую стратегию лечения больных с повреждением спинного мозга [75,76].

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Virchow R.* Cellular pathology as based upon physiological histology. Ed. 2 New York, (1971) P.356-382.
2. *Flemming W.* Uber die Bildung von Richtungsfiguren in Saugethierein beim Untergang Graaf scher Folikel. (1885) Arch. Anat. Entw Gesch. P221-224
3. *Weigert C.* 1890. *From Magno G., Joris I.* Apoptosis, oncosis and necrosis.an overview of cell death. (1995).Amer. J. Pathol. **146**, 3-5.
4. *Gluksmann A.* (1951). Biol. Rev. **26**, 59.
5. *Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.* (1972) Brit. J. Cancer, **26**, 239-257.
6. *Lou J., Lenke L.G., Ludwig F.J., O'Brien M.F.* (1998) Spinal Cord **10**, 683-690.
7. *Yong C., Arnold P.M., Zoubine M.N., Citron B.A., Watanabe I., Berman N.E., Festoff B.W.* (1998). J. Neurotrauma **15**, 459-472.
8. *Emery E., Aldana P., Bunge M.B., Puckett W., Srinivasan A., Keane R.W., Bethea J., Levi A.D.* (1998) J. Neurosurg. **89**, 911-920.
9. *Lockshin R.A., Zakeri-Milovanovic Z.* (1984) In: Nucleic acids in cell death. Cell ageing and cell death (Eds. I. Devis, and D.C. Sigl.) Cambridge, P.243.
10. *Harmon B.V., Corder A.M., Collins R.J., Gobe G.C., Allen J., Allan D.J., Kerr J.F.* (1990) Intern. Radiat. Biol. **58**, 845-858.
11. *Li G.L., Farooque M., Holtz A., Olsson Y.* (1999) Acta Neuropathol. (Berl) **98**, 473-480.
12. *Rink A., Fung K.M., Trojanowski J.Q., Lee V.M., Neugebauer E., McIntosh T.K.* (1995) Am. J. Pathol. **147**, 1575-1583.
13. *Akiyama K., Gluckman T.L., Terhakopian A., Jinadasa P.M., Narayan S., Singaswamy S., Massey B. 3rd; Bing R.J.* (1997) Tissue Cell **29**, 733-743.
14. *Jaffe R., Ariel I.; Beeri R., Paltiel O., Hiss Y., Rosen S., Brezis M.* (1997) Exp. Nephrol. **5**, 399-403.
15. *Newcomb J.K., Zhao X., Pike B.R., Hayes R.L.* (1999) Exp. Neurol. **158**, 76-88.
16. *Crowe MJ; Bresnahan JC; Shuman SL; Masters JN; Beattie MS* (1997) Nat. Med. **3**, 73-76.
17. *Liu X.Z., Xu X.M.; Hu R., Du C., Zhang S.X., McDonald J.W., Dong H.X., Wu Y.J., Fan G.S., Jacquin M.F., Hsu C.Y., Choi D.W.* (1997) J. Neurosci. **17**, 5395-5406.
18. *Shuman S.L., Bresnahan J.C., Beattie M.S.* (1997) J. Neurosci. Res. **50**, 798-808.
19. *Abe Y., Yamamoto T., Sugiyama Y., Watanabe T., Saito N., Kayama H., Kumagai T.* (1999) J. Neurotrauma **16**, 945-952.
20. *Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, et al.* (1993) Adv. Neurol. **59**:75-89.

21. Katoh K., Ikata T., Katoh S., Hamada Y., Nakauchi K., Sano T., Niwa M. (1996) *Neurosci. Lett.* **216**, 9-12.
22. Sakurai M., Hayashi T., Abe K., Sadahiro M., Tabayashi K. (1998) *J. Thorac Cardiovasc. Surg.* **115**, 1310-1315.
23. Sakurai M., Hayashi T., Abe K., Sadahiro M., Tabayashi K. (1998) *Brain. Res.* **797**, 23-28.
24. Saito N., Yamamoto T., Watanabe T., Abe Y., Kumagai T. (2000) *J. Neurotrauma* **17**, 173-182.
25. Li G.L., Brodin G., Farooque M., Funa K., Holtz A., Wang W.L., Olsson Y. (1996) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 280-289.
26. Gillardon F., Klimaschewski L., Wickert H., Krajewski S., Reed J.C., Zimmermann M. (1996) *Brain Res.* **739**, 244-250.
27. Farooq M., Olsson Y., Hillered L. (1997) *J. Neurotrauma* **14**, 469-476.
28. Rawe S.E., Lee W.A., Perot P.J. Jr. (1989) *J. Neurosurg.* **48**, 1002-1007.
29. Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. (1980) *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
30. Takahashi A. (1999) *Int. J. Hematol.* **70**, 226-232.
31. Robertson G.S., Crocker S.J., Nicholson D.W., Schulz J.B. (2000) *Brain Pathol.* **10**, 283-292.
32. Pike B.R., Zhao X., Newcomb J.K., Wang K.K., Posmantur R.M., Hayes R.L. (1998) *J. Neurosci. Res.* **52**, 505-520.
33. Nakahara S., Yone K., Sakou T., Wada S., Nagamine T., Niiyama T., Ichijo H. (1999) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 442-450.
34. Springer J.E., Azbill R.D., Knapp P.E. (1999) *Nat. Med.* **5**, 943-946.
35. Schuler H., Lindberg U., Schutt C.E., Karlsson R. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 476-486.
36. James S.J., Miller B.J., Basnakian A.G., Pogribny I.P., Pogribna M., Muskhelishvili L. (1997) *Carcinogenesis* **18**, 287-293.
37. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. (1998) *Nature* **391** (6662), 43-50.
38. Mukae N., Enari M., Sakahira H., Fukuda Y., Inazawa J., Toh H., Nagata S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 9123-9128.
39. Polzar B., Zanotti S., Stephan H., Rauch F., Peitsch M.C., Irmeler M., Tschopp J., Mannherz H.G. (1994) *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 200-210.
40. Yasuda T., Takeshita H., Iida R., Nakajima T., Hosomi O., Nakashima Y., Kishi K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2610-2616.
41. Mannherz H.G., Peitsch M.C., Zanotti S., Paddenberger R., Polzar B. (1995) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **198**, 161-174.
42. Takeshita H., Mogi K., Yasuda T., Nakajima T., Nakashima Y., Mori S., Hoshino T., Kishi K. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 481-484.
43. Pravdenkova S.V., Basnakian A.G., James S.J., Andersen B.J. (1996) *Brain Res.* **729**, 151-155.
44. Ходарев Н.Н., Вотрин И.И., Баснакян А.Г., Дебов С.С. (1979) *Биохимия*, **44**, 622-628.
45. Radford I.R. (1985) *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **48**, 45-54.

46. Gu Z.Z., Pan Y.C., Cui J.K., Klebuc M.J., Shenag S., Liu P.K. (1997) *Neurochem. Int.* **30**, 417-426.
47. Collins J.A., Schandi C.A., Young K.K., Vesely J., Willingham M.C. (1997) *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 923-934.
48. Walker P.R., Leblanc J., Smith B., Pandey S., Sikorska M. (1999) *Methods* **17**, 329-338.
49. Basnakian A.G. and James S.J. (1996) *DNA & Cell. Biol.* **15**, 255-262.
50. Basnakian A.G. and James S.J. (1994) *Nucl. Acids Res.* **22**, 2714-2715.
51. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 493-501.
52. Wijsman J.H., Jonker R.R., Keijzer R., van de Velde C.J., Cornelisse C.J., van Dierendonck J.H. (1993) *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 7-12.
53. Christensen M.D., Supowit S.C., DiPetter D.J., Halsebosch C.E. (1996) *J. Neurotrauma* **13**, 602.
54. Cervos-Navarro J., Schubert T.E. (1996) *Brain Pathol* **6**, 347-348.
55. Krajewska M., Wang H.G., Krajewski S., Zapata J.M., Shabaik A., Gascoyne R., Reed J.C. (1997) *Cancer Res.* **57**, 1605-1613.
56. Groves M.J., An S.F., Giometto B., Scaravilli F. (1999) *Exp. Neurol.* **155**, 284-294.
57. Kato H., Kanellopoulos G.K., Matsuo S., Wu Y.J., Jacquin M.F., Hsu C.Y., Choi D.W., Kouchoukos N.T. (1997) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **114**, 609-618.
58. Wada S., Yone K., Ishidou Y., Nagamine T., Nakahara S., Niiyama T., Sakou T. (1999) *J. Neurosurg.* **91** (1 Suppl), 98-104.
59. Ray S.K., Wilford G.G., Matzelle D.C., Hogan E.L., Banik N.L. (1999) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **890**, 261-269.
60. Ghirnikar R.S., Lee Y.L., Eng L.F. (2000) *J. Neurosci. Res.* **59**, 63-73.
61. Hu W.H., Qiang W.A., Li F., Liu N., Wang G.Q., Wang H.Y., Wan X.S., Liao W.H., Liu J.S., Jen M.F. (2000) *J. Chem. Neuroanat.* **17**, 183-197.
62. Kawamura T., Akira T., Watanabe M., Kagitani Y. (1997) *Neuropharmacology* **36**, 1023-1030.
63. Lang-Lazdunski L., Heurteaux C., Vaillant N., Widmann C., Lazdunski M. (1999) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **117**, 881-889.
64. Broadus W.C., Prabhu S.S., Gillies G.T., Neal J., Conrad W.S., Chen Z.J., Fillmore H., Young H.F. (1998) *J. Neurosurg.* **88**, 734-742.
65. Prius J., De Vries E.G., Mulder N.H. (1993) *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* **5**, 245-252.
66. Woolf T.M. (1995) *Antisense Res. Dev.* **5**, 215-232.
67. Zon G. (1995) *Mol. Neurobiol.* **1**, 219-229.
68. Holmes K.D., Cassam A.K., Chan B., Peters A.A., Weaver L.C., Dekaban G.A. (2000) *J. Neurovirol.* **6**, 33-45.
69. Boulis N.M., Turner D.E., Dice J.A., Bhatia V., Feldman E.L. (1999) *Neurosurgery* **45**, 131-137; discussion 137-138.
70. Romero M.I., Smith G.M. (1998) *Gene Ther.* **5**, 1612-1621.
71. Kennedy P.G. (1997) *Brain* **120** (Pt. 7), 1245-1259.
72. Woerly S., Pinet E., De Robertis L., Bousmina M., Laroche G., Roitback T., Vargova L., Sykova E. (1998) *Biomater. Sci. Polym.* **9**, 681-711.
73. Reese B.E., Thompson W.F., Peduzzi J.D. (1994) *J. Comp. Neurol.* **341**, 464-475.



74. *Dupont-Versteegden E.E., Murphy R.J., Houle J.D., Gurley CM., Peterson C., A.* (1999) *Am. J. Physiol.* **277**(3 Pt 1), 589-597.
75. *Chopp M., Chan P.H., Hsu C.Y., Cheung M.E., Jacobs T.P.,* (1996). National Institute of Neurological Disorders and Stroke Workshop Summary 27, 363-369.
76. *Ridet J.L., Penelet P., Belcram M., Giraudeau B., Chastang C., Philippon J., Mallet J., Privat A., Schwartz L.* (2000) *Exp. Neurol.* **161**, 1-14.

Поступила 24.04.2000

# **APOPTOSIS AFTER TRAUMATIC SPINAL CORD INJURY: PROSPECTS OF THE PHARMACOLOGICAL CORRECTION REVIEW**

A.G.BASNAKIAN<sup>1</sup>, A.V.BASKOV<sup>2</sup>, N.N.SOKOLOV<sup>3</sup>, I.A.BORSHENKO<sup>2</sup>

\*University of Arkansas for Medical Sciences 4301 West Markham, Slot 501 Little Rock, Arkansas  
72211 USA

Tel./fax: (501) 257-48-33/257-58-27; E.mail: basnakianalexeig@exchange.uams.edu

\*\* Burdenko Research Institute for Neurosurgery RAMS

Fadeeva str. 5, 125047 Moscow

Tel./fax (095) 251-65-26/975-22-28; E.mail: abaskov@mail.ru

\*\*\*Orechovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya str. 10, 119832 Moscow;  
Tel./fax: (095) 246-33-80/(095) 245-08-57; E.mail: sokolov@ibmh.msk.su

Spinal trauma is a serious problem of modern medicine. The morphological studies illustrate the presence of two alternative pathways of cell destruction in the injured spinal cord: immediate necrotic damage and delayed apoptotic destruction of cells. The apoptosis continues for about 14 days after trauma, and it involves both neurons and glia on a significant distance from the traumatic zone. In this review, the basic stages of apoptosis in spinal cord, biochemical regulation of this process, and methods for its detection are considered. The fact, that apoptosis is a normal cell death process, and that it has reversible stages allows to consider a possibility of pharmacological correction of apoptosis. The special attention is paid to anti-apoptotic therapy with the use of antisense oligodeoxynucleotides and to the perspectives of gene therapy.

**Key words:** apoptosis, spinal cord trauma, antiapoptotic therapy, gene therapy antisense oligonucleotides