

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ. НЕЙРОПРОТЕКЦИЯ ЦЕРЕБРОКУРИНОМ

И.Ф. БЕЛЕНИЧЕВ, Ю.М. КОЛЕСНИК, С.В. ПАВЛОВ, А.В. АБРАМОВ, Н.В. БУХТИЯРОВА
Запорожский государственный медицинский университет

Актуальность исследования различных видов церебральной патологии и разработки методов их лечения не требует детального обоснования. Всемирная организация здравоохранения определяет смерть человека как гибель мозга, который при жизни контролирует все важнейшие функции. По распространенности и смертности заболевания головного мозга занимают третье место среди заболеваний населения промышленно развитых стран, приводят не только к уменьшению продолжительности жизни населения, но и ограничивают социальную активность человека в силу развития когнитивного дефицита, снижения способности индивидуума к мышлению, обучению, адекватному восприятию информации и принятию решений. При заболевании мозга деструктивного и дегенеративного генеза происходит нарушение дыхательной цепи митохондрий, энергетического обмена, ионного гомеостаза клетки с повышенным содержанием ионов кальция, развитие глутаматной эксайтотоксичности и повреждающего действия нитрозирующего и оксидативного стресса, инициация нейроапоптоза и гибели клетки. Активация нейроапоптоза, по мнению многих исследователей, является первопричиной развития стойких нарушений когнитивно-мнестических функций ЦНС. Нейроапоптоз развивается как каскадный процесс, который сопровождается активацией (индукцией образования) специфических про- или антиапоптотических белков, а также особых протеолитических ферментов — каспаз. Среди факторов запуска апоптоза следует отметить образование активных форм кислорода в процессе «извращенного» пути окислительного метаболизма в клетке. Существуют убедительные доказательства того, что центральная роль в продукции АФК и последующем развитии апоптоза и некроза принадлежит митохондриям, изменению проницаемости их мембран в результате формирования специфического комплекса митохондриальных пор и инициированию митоптоза. Первичным источником АФК оказываются митохондрии, которые играют ключевую роль в энергетическом обеспечении клетки. АФК, особенно супероксид, образуются в условиях ишемии и гипоксии в так называемых паразитарных реакциях, в начальном участке дыхательной цепи митохондрий ($\text{CoQH}_2\text{-NAD}^+$) при участии $\text{NADH-CoQH}_2\text{-редуктазы}$, активность которой повышается при блокаде цитохром-С-зависимого ре-

цептора на внешней поверхности мембраны митохондрии на фоне повышения восстановленных флавинов. Кроме супероксида, ключевую роль в развитии митохондриальных нарушений и апоптоза принадлежит NO и его более агрессивной форме — пероксинитриту. Митохондрия нейронов является важным источником NO. Показано наличие конститутивной формы NOS, локализованной во внутренней мембране, и производство NO в митохондриях нейронов гиппокампа. Митохондриальная NOS при субоптимальных концентрациях L-аргинина способна продуцировать супероксид. Митохондриальная NOS значительно активируется в ответ на развитие глутаматной эксайтотоксичности и поглощение митохондриями кальция. Кроме того, в активации митохондриальной NOS определенная роль принадлежит ИЛ-1 β и TNF- α . В результате образуется пероксинитрит, способствующий открытию гигантской поры митохондрий. Пероксинитрит также нитрозирует цитохром С в митохондриях, что приводит к изменению его функций, в частности он становится неспособным поддерживать перенос электронов в дыхательной цепи и не восстанавливается аскорбатом. Поскольку одновременно происходит выход цитохрома С (в том числе и нитрованного) в цитоплазму, то можно предполагать участие такого процесса нитрозирования и в каких-то сигнальных процессах. Пероксинитрит нитрозирует гуанин, что приводит к разрыву цепочек ДНК и к мутациям или запуску процессов апоптоза. Избыток NO ингибирует ферменты, ответственные за репарацию ДНК, показано действие на алкилтрансферазу, формамидопиримидин-ДНК-гликозилазу и лигазу. NO активирует PARP и АДФ-рибозилирование, особенно на фоне дефицита АТФ и накопления восстановленных пиридиннуклеотидов. NO позитивно влияет на синтез белка p53, который индуцирует экспрессию Bax, Fas, p53AIP (apoptosis inducing protein) и других апоптогенных белков, а также перемещается в митохондрию при апоптозе, что может быть одной из причин выработки АФК и снижения трансмембранного потенциала на внутренней мембране. Ныне существует обобщенное понятие «митохондриальная дисфункция». Это типовой патологический процесс, не имеющий этиологической и нозологической специфичности. Развитие митохондриальной дисфункции приводит к нарушению обратного захвата медиаторов (катехоламинов, дофамина, серо-

тонина), ионного транспорта, генерации и проведения импульса, синтеза белка *de novo*, процессов трансляции и транскрипции; активизируются «паразитарные» энергопродуцирующие реакции, что приводит к существенной убыли энергетических запасов нейрональной клетки. Кроме того, под действием гидроксил-радикала происходит открытие митохондриальных пор с экспрессией и выходом в цитозоль проапоптотических белков. Открытие пор происходит за счет окисления тиольных групп цистеинзависимого участка белка внутренней мембраны митохондрий (АТФ/АДФ-антипортер), что превращает его в проницаемый неспецифический канал-пору. Открытие пор превращает митохондрию из «электростанций» в «топку» субстратов окисления без образования АТФ. В точных биохимических исследованиях было установлено, что нарушение кислородного режима тканей, гиперпродукция эксайтотоксичных аминокислот, снижение «нормальной» аккумуляции Ca^{2+} митохондриями, повреждение мембраны митохондрий АФК усиливает открытие пор и высвобождение апоптогенных белков из поврежденных митохондрий. В этом контексте существенна роль одного из нейротрофических факторов — фактора некроза опухоли- α (TNF- α), с которым связаны открытие пор в митохондриях, последующее нарушение их мембран и развитие митоптоза. Митохондриальная пора представляет собой канал, проходящий через обе митохондриальные мембраны и состоящий из трех белков: транслокатора адениновых нуклеотидов, потенциалазависимого анионного канала (порина) и бензодиазепинового рецептора. Когда этот комплекс связывается с Ca^{2+} , через мембранную пору могут проходить вещества с небольшой молекулярной массой. Это приводит к снижению мембранного потенциала и набуханию матрикса, целостность внешней мембраны неизбежно нарушается, и из межмембранного пространства в цитоплазму выходят белки апоптоза. Их несколько: фактор, индуцирующий апоптоз (APOptosis-inducing factor), вторичный митохондриальный активатор каспаз (second mitochondria-derived activator of caspases — Smac) и некоторые прокаспазы. Индуцирующий фактор направляется прямо в ядро, где вызывает деградацию ДНК. Наряду со специфическими апоптозными белками из митохондрии через открытую пору выходит цитохром С, который в норме служит конечным звеном электронтранспортной цепи. В цитоплазме этот белок связывается с белком Araf-1 (APOptotic protease activating factor-1 — активирующий протеазу фактор 1) и формирует апоптосомный комплекс. Он с помощью Smac и еще одного фактора (Omi/HtrA2) активирует прокаспазу-9, которая, став каспазой-9, превращает два других профермента в каспазы-3 и 7; а они уже расщепляют структурные белки, приводя к появлению биохимических и морфологических признаков апоптоза. В числе первых можно назвать, в частности, переход фосфатидилсерина в наружный мембранный слой и фрагментацию ДНК под действием АФК и NO. Из вторых признаков наиболее характерны «отшелушивание» клетки от матрикса,

сморщивание мембраны, сжатие ядра и формирование пузырьков с клеточным содержимым — апоптозных телец. Выходу цитохрома С в цитоплазму способствуют снижение рН при развитии лактат-ацидоза, усиление окислительной модификации митохондриальных белков и липидов. Последнюю реакцию как раз и вызывают АФК, которые неизбежно образуются в результате «паразитарных» энергетических реакций. Цитохром С может высвободиться в ответ на повышение концентрации ионов Ca^{2+} , которое вызывает открывание поры, а также контролироваться белками семейства Bcl-2. Именно они регулируют апоптоз на уровне митохондрий. Одни из белков этого большого семейства (Bcl-2, а также Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Al и Boo) предотвращают апоптоз; другие (Bax, Bad, Bok, Bcl-xS, Bak, Bid, Bik, Bim, Krk, и Mtd) способствуют его инициации. Bcl-2 действует как нейроантиоксидант — блокирует выход цитохрома С и предотвращает развитие апоптоза. В запуске апоптоза, вызванного повреждениями ДНК, активацией онкогенов и гипоксией, принимает участие белок 53 (p53), взаимодействуя с Bax, стимулируя «рецепторы смерти» и апоптозные гены. p53 активирует модулятор суицида PUMA (p53 upregulated modulator of APOptosis), который затем связывает Bcl-2 и выводит из строя этот препятствующий апоптозу белок. Тем самым выход цитохрома С из митохондрий уже ничем не сдерживается. Некоторые белки, связывающие ионы кальция, например ALG-2, кодируемый одноименным геном (APOptosis-linked gene-2), тоже принимают участие в развитии нейроапоптоза. Так, путем взаимодействия ALG-2 и белка Alix (ALG-interacting protein X, известный и как AIP1) осуществляется регуляция нейроапоптоза. Таким образом, можно говорить о митохондриальной дисфункции как о новом патобиохимическом механизме нейродегенеративных расстройств широкого спектра. В настоящий момент выделяют два вида митохондриальной дисфункции — первичную как следствие врожденного генетического дефекта и вторичную, возникающую под действием различных факторов: гипоксии, ишемии, оксидативного и нитрозирующего стресса, экспрессия провоспалительных цитокинов. В современной медицине все более значимое положение занимает учение о полисистемных нарушениях клеточного энергообмена, так называемая митохондриальная патология, или митохондриальная дисфункция. Ключевая область этого раздела медицины — наследственные синдромы, в основе которых лежат мутации генов, ответственных за митохондриальные белки (синдромы Кернса — Сейра, MELAS, MERRF, Пирсона, Барта и др.). Однако класс состояний, характеризующихся митохондриальной дисфункцией, отнюдь не ограничивается этими первичными митохондриальными дисфункциями. Громадное количество болезней включают нарушения клеточного энергообмена — вторичные митохондриальные дисфункции в качестве важных звеньев патогенеза. Среди них: интрацеребральная геморагия, эпилептогенные судороги, локальное термическое повреждение мозга, нейродегенеративные рас-

стройства, транзиторная церебральная ишемия, синдром хронической усталости, мигрени, кардиомиопатии, алкогольные энцефалопатии, сенильная деменция, нейроинфекции, кардиомиопатии, гликогенозы, болезни соединительной ткани, диабет, рахит, тубулопатии, панцитопения, гипопаратиреоз, печеночная недостаточность и многое другое. Особое значение изучение указанных нарушений имеет для практической медицины в связи с наличием достаточно эффективных возможностей терапевтической коррекции. Однако при этом следует принять во внимание, что спектр патологических нарушений клеточного энергообмена чрезвычайно велик (повреждения различных звеньев цикла Кребса, дыхательной цепи, бета-окисления и др.).

С явлением митохондриальной дисфункции тесно связана гиперэкспрессия ранних генов — *c-fos*. Так, в условиях гиперпродукции АФК нейрхимическими и биоэнергетическими системами головного мозга в условиях ишемии головного мозга, а также при ряде других нейродеструктивных патологических процессов происходит активация экспрессии редоксчувствительных генов, многие из которых необходимы для защиты клеток от токсических эффектов окислительного стресса. Так, при нормальной концентрации кислорода в окружающей клетку среде (нормоксия) под действием АФК происходит в основном активация JunB, ATF-2 — факторов транскрипции, а в условиях окислительного стресса — преимущественно факторов *c-Jun* и *c-fos*. Активация именно этих факторов транскрипции в условиях гиперпродукции АФК объясняется тем, что JunB и *c-fos* содержат в своих ДНК-связывающих доменах высокочувствительные к АФК остатки цистеина — Cys252, Cys54, Cys61. Окисление их SH-групп приводит к обратной инактивации AP-1 и NF-κB. Помимо этого, белок *c-fos* непосредственно участвует в процессе фрагментации митохондриальной ДНК и инициировании процессов апоптотической гибели нейрональной клетки. *c-fos* ответственен за гиперпродукцию NO при нейродеструктивных заболеваниях посредством активации индуцибельной NO-синтазы. *c-fos* представляет собой одну из основных ядерных мишеней для передачи сигналов регуляции клеточного роста и трансформации, вовлечен во множество клеточных функций, в том числе в процессы клеточной пролиферации и дифференцировки.

Все вышеизложенное является обоснованием для поиска высокоэффективных церебропротективных препаратов, способных предотвращать негативные процессы митохондриальной дисфункции в клетке, тем самым оказывая церебропротективное действие. В настоящее время с целью коррекции митохондриальной дисфункции осуществляются попытки использовать энерготропные препараты — коэнзим Q10, карнитин, витаминные группы B, производные янтарной кислоты и т.д. Однако рациональные основы для их применения плохо разработаны, часто недостаточно используются эффективные подходы или переоцениваются неэффективные, лекарства применяются хаотично, без достаточных зна-

ний об их возможностях и особенностях, без планирования стратегии лечения с позиций целесообразности. Кроме того, при уже сформированной митохондриальной дисфункции и «запуске» апоптотических процессов эти препараты малоэффективны, так как не способны участвовать в регуляции тех тонких звеньев энергетического метаболизма, интермедиатами которых они являются. Рассматривается и другое направление коррекции митохондриальной дисфункции — применение тиольных антиоксидантов, конкурирующих с SH-группами цистеинзависимого участка белка внутренней мембраны митохондрий (АТФ/АДФ-антипортер) за АФК и пероксинитрит и образующих с последним стойкие комплексы. Это позволяет предотвратить открытие митохондриальной поры в условиях окислительного и нитрозирующего стресса. Интересным и заслуживающим особого внимания представляется применение препаратов, являющихся лигандами нейропептидных рецепторов и способных регулировать апоптоз, экспрессию транскрипционных факторов, синтез ферментов, регенерирующих митохондриальную ДНК, и ферментов, катализирующих энергетические реакции.

В последнее время активно ведется поиск высокоэффективных нейропротекторов среди нейропептидов. Новым направлением в исследовании нейропептидов стало определение их роли в регуляции апоптоза, а также их влияния на экспрессию генов раннего реагирования. Наряду с данными, свидетельствующими об участии вазоактивного пептида эндотелина-1 и его рецепторов (ETA) в ишемической патологии мозга, получена информация об антиапоптотическом активности этого пептида. На ряде моделей нейроапоптоза было также продемонстрировано защитное действие кальцитонинового нейропептида (CGRP) и пептидного фрагмента ангиотензина IV. В то же время было установлено, что сам ангиотензин II, как и пептид кальций-нейрин, напротив, способствует индукции проапоптотического каскада. Эти факты, демонстрирующие значимость нейропептидов и ростовых факторов в нормальной и патологической деятельности мозга, отражают организацию поливариантной системы химической регуляции, обеспечивающей как жизнеспособность и защиту нейронов от неблагоприятных влияний, так и программируемую гибель определенной части клеточной популяции в случае повреждения мозга. Открытие нейротрофических пептидных факторов побудило к формированию новой стратегии фармакотерапии — пептидергической, или нейротрофической, терапии нейродегенеративных заболеваний. Исходная идеология связывает нейродегенеративные процессы, включая болезнь Альцгеймера, с активностью различных нейротрофических факторов мозга и нейропептидов. На этой основе был разработан ряд препаратов, успешно применяемых в терапии большого спектра неврологических расстройств. Наибольший успех здесь выпал на долю Цереброкурина, который уже в течение десяти лет успешно используется в клинике неврологических и психиатрических заболеваний. Нейропептиды свободно проникают через гематоэнцефалический барьер и оказывают многосто-

роннее действие на ЦНС, что сопровождается высокой эффективностью и выраженной направленностью действия при условии очень малой их концентрации в организме. Тесная взаимосвязь всех отдаленных последствий ишемии, а также общность их триггерных механизмов позволяют наряду с локальным воздействием на них использовать модулирующие влияния через системы регуляторов, осуществляющих контроль за экспрессией вторичных клеточных мессенджеров, цитокинов и других сигнальных молекул, а также за запуском генетических программ апоптоза, антиапоптозной защиты, усиления нейротрофического обеспечения. Такие регуляторные (модуляторные) влияния устраняют общую дезинтеграцию во взаимодействии сложных и часто разнонаправленных молекулярно-биохимических механизмов, восстанавливая их нормальный баланс. Особо важную роль играют эндогенные регуляторы функций ЦНС — нейропептиды. Их молекулы, представляющие собой короткие аминокислотные цепи, «нарезаются» из более крупных белковых молекул-предшественников ферментами протеолиза («процессинг») лишь «в нужном месте и в нужное время» в зависимости от потребностей организма. Нейропептиды существуют всего несколько секунд, но длительность их действия может измеряться часами. Эндогенное образование нейропептида в ответ на какое-либо изменение внутренней среды приводит к высвобождению ряда других пептидов, для которых первый является индуктором. Если их совместное действие однонаправлено, эффект будет суммированным и продолжительным. Выход пептида может регулироваться несколькими регуляторными пептидами предыдущего каскада. Таким образом, эффекторная последовательность совокупности пептидов образует так называемый пептидный регуляторный континуум, особенностью которого заключается в том, что каждый из регуляторных пептидов способен индуцировать или ингибировать выход ряда других пептидов. В результате первичные эффекты того или иного пептида могут развиваться во времени в виде цепных и каскадных процессов.

Особенностью структуры нейропептидов является наличие нескольких лигандных групп связывания, предназначенных для разных клеточных рецепторов. Это одно из «молекулярных» объяснений присущей им полифункциональности. Физиологическая активность нейропептидов во много раз превышает аналогичное действие непептидных соединений. В зависимости от места их высвобождения нейропептиды могут осуществлять медиаторную функцию (передачу сигнала от одной клетки к другой); модулировать реактивность определенных групп нейронов; стимулировать или тормозить выброс гормонов; регулировать тканевый метаболизм или выполнять функцию эффекторных физиологически активных агентов (вазомоторная, Na^+ -уретическая и другие виды регуляции). Известно, что нейропептиды способны регулировать активность про- и противовоспалительных цитокинов через модуляцию активности их рецепторов. При этом восстановление нормального баланса цитокинов происходит более эффективно, чем при воздействии

на отдельные цитокиновые системы. Как правило, «цитокиновые» эффекты нейропептидов сопровождаются их влиянием на генерацию оксида азота и другие оксидантные процессы. Многие нейропептиды проявляют выраженные нейротрофические ростовые свойства, а также способны регулировать экспрессию ранних генов. С учетом того что нейропептиды легко проникают через гематоэнцефалический барьер (в отличие от полипептидных цепей факторов роста), трудно переоценить их потенциальную терапевтическую значимость. Одним из наиболее перспективных препаратов нейротрофического ряда является Цереброкурин, который содержит свободные аминокислоты, нейропептиды и низкомолекулярные продукты контролируемого протеолиза низкомолекулярных белков и пептидов эмбрионов крупного рогатого скота. Механизм действия и точки приложения Цереброкурина принципиально отличаются от других препаратов нейропептидной природы. Цереброкурин содержит пептиды, несущие в себе программу анализа состояния и строительства ЦНС. Таким образом, конечный эффект различается из-за качественно отличного механизма действия. Защитные эффекты Цереброкурина на ткань мозга включают его оптимизирующее действие на энергетический метаболизм мозга и гомеостаз кальция, стимуляцию внутриклеточного синтеза белка, замедление процессов глутамат-кальциевого каскада и перекисного окисления липидов. Вместе с тем препарат обладает выраженными нейротрофическими эффектами. В исследованиях, проведенных в последние годы, установлена способность Цереброкурина повышать экспрессию гена транспортера глюкозы (GLUT-1) через гематоэнцефалический барьер и таким образом увеличивать ее транспорт к головному мозгу в условиях экспериментальной ишемии.

Показано также, что нейротрофические свойства Цереброкурина связаны с защитой цитоскелета нейронов вследствие ингибирования кальцийзависимых протеаз, в том числе кальпаина, и увеличения экспрессии микротубулярного кислого протеина-2 (MAP2). Наряду с этим Цереброкурин увеличивает аффинность связывания BDNF с его рецепторами. Влияние препарата на trk-B -рецепторы нейротрофинов может свидетельствовать о вовлечении его в регуляцию естественных факторов роста. В экспериментальных исследованиях выявлена способность Цереброкурина предотвращать гиперактивацию микроглии и снижать продукцию ИЛ-1 α и других провоспалительных цитокинов, что отражает влияние препарата на выраженность местной воспалительной реакции и процессов оксидантного стресса в ишемизированной зоне мозга. В наших работах показано, что применение Цереброкурина при острой церебральной ишемии способствует лучшему выживанию нейронов в зоне ишемической полутени и торможению отсроченной гибели нейронов.

В проведенных нами экспериментальных исследованиях также показана достаточно высокая эффективность Цереброкурина в условиях моделирования ишемии головного мозга на монгольских песчанках. Так,

курсовое назначение Цереброкурина крысам линии Вистар с двухсторонней перевязкой общих сонных артерий (моделирование ОНМК) приводило к значительному снижению (в среднем на 67 %) процессов

окислительной деструкции белков в суспензии митохондрий нейронов сенсомоторной зоны коры мозга. Подобное антиоксидантное действие Цереброкурина объясняет и его позитивное влияние на процессы митохондриальной дисфункции в условиях моделирования ОНМК.

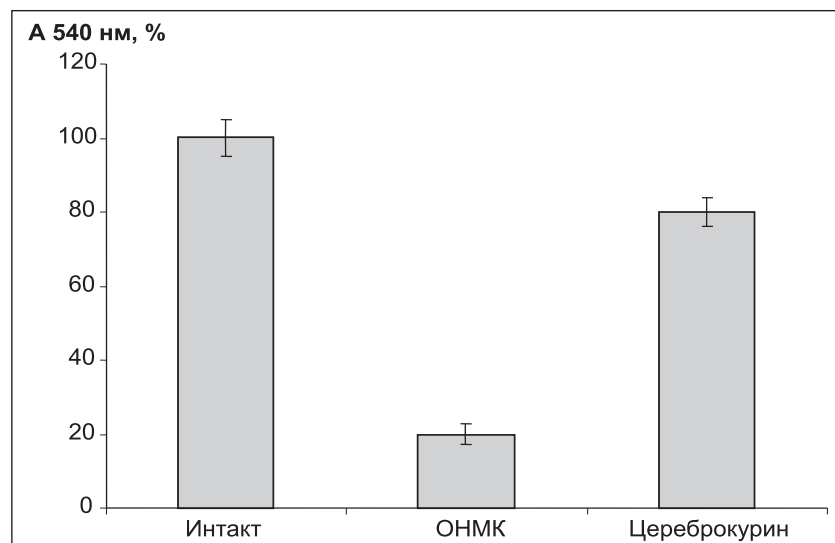


Рисунок 1. Влияние Цереброкурина (0,0050 мл/кг) на открытие митохондриальной поры нейроцитов крыс с ОНМК (4-е сутки)

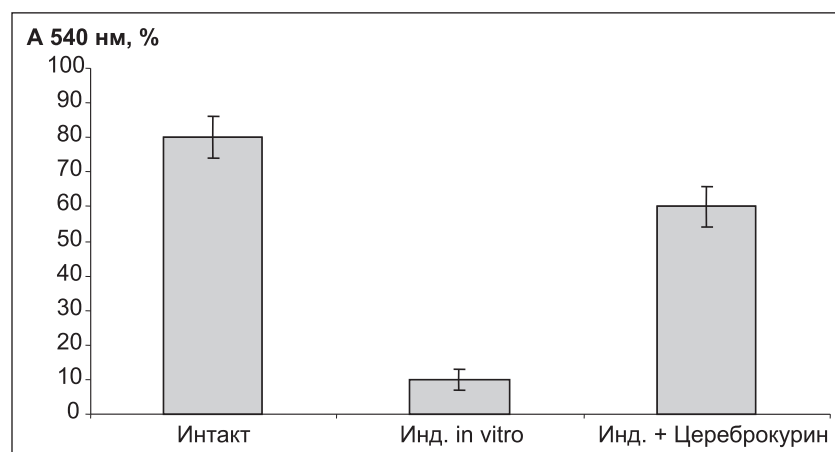


Рисунок 2. Влияние Цереброкурина (0,400 мл) на индуцированное Ca^{2+} (0,6 мМ) и МФП (0,4 мМ) открытие митохондриальной поры нейроцитов *in vitro*

тохондриальной дисфункции в условиях моделирования ОНМК. Так, было выявлено способность Цереброкурина тормозить открытие митохондриальной циклоспорин-А-зависимой поры на 4-е сутки модельной патологии (рис. 1). Важно отметить, что данный эффект Цереброкурин продемонстрировал и в опытах *in vitro* при введении в инкубационную смесь, содержащую митохондрии, нейронов гиппокампа ионов Ca^{2+} (0,6 мМ) и нейротоксина — метилфенилпиридиния (МФП) (0,4 мМ) (рис. 2).

Позитивное действие Цереброкурина в отношении функциональной активности митохондрий мозга выразилось и в нормализации энергетического обмена (табл. 1). Так, при введении Цереброкурина в головном мозге животных с ОНМК наблюдалось увеличение продукции АТФ в окислительных реакциях, о чем свидетельствовало увеличение содержания малата, повышение активности митохондриальной малатдегидрогеназы и цитохром-С-оксидазы. Цереброкурин влиял не только на продукцию энергии, но и на ее транспорт и утилизацию, о чем свидетельствовало повышение активности митохондриальной и цитоплазматической креатинфосфокиназы. Важным моментом в действии Цереброкурина на энергетический обмен в условиях ишемии мозга было значительное снижение продукции лактата и лактат-ацидоза.

Таблица 1. Показатели окислительной продукции энергии в головном мозге на 4-е сутки ОНМК

Исследуемые показатели	ОНМК (контроль)	ОНМК + Цереброкурин	Интакт
АТФ, мкм/г	1,00 ± 0,05	1,89 ± 0,07 $P_{ST} < 0,05$	2,77 ± 0,11
Лактат, мкм/г	7,45 ± 0,11	4,87 ± 0,11 $P_{ST} < 0,05$	2,61 ± 0,12
Малат, мкм/г	0,18 ± 0,01	0,45 ± 0,01 $P_{ST} < 0,05$	0,38 ± 0,02
МДГ, мкм/г/мин	5,34 ± 0,12	7,64 ± 0,10 $P_{ST} < 0,05$	8,17 ± 0,08
КФКц, мкм/мг/мин	0,801 ± 0,010	1,117 ± 0,030	1,347 ± 0,020
КФКм, мкм/мг/мин	0,412 ± 0,020	0,775 ± 0,010 $P_{ST} < 0,05$	0,845 ± 0,050
Цитохром-С-оксидаза, мкм/мг/мин	3,11 ± 0,20	4,932 ± 0,100	5,89 ± 0,10

Примечания: МДГ — малатдегидрогеназа; КФКм — митохондриальная креатинфосфокиназа; КФКц — цитоплазматическая креатинфосфокиназа.

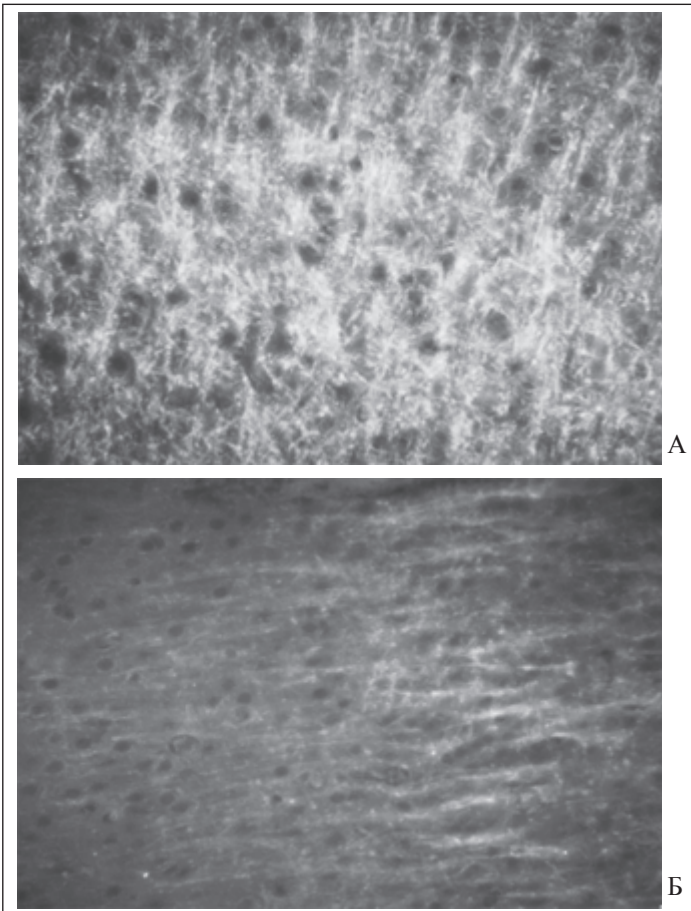


Рисунок 3. Экспрессия белка c-fos в нейронах СА1-зоны гиппокампа у животных с ХИС. Реакция непрямо́й иммунофлюоресценции (первичные антитела c-fos (Sigma Chemical, США), вторичные антитела — флюоресцент конъюгированный с козьими Ig (Sigma Chemical, США)). Изображение флюоресцентного микроскопа Axioskop (Zeiss, Germany), видеокамера СОНУ-4922 (США)

Одним из ключевых моментов в нейропротективном эффекте Цереброкурина оказалось его влияние на гиперэкспрессию гена c-fos в условиях ОНМК. Так, лечебно-профилактическое введение Цереброкурина животным при моделировании хронического иммобилизационного стресса приводило к достоверному снижению ($p < 0,01$) числа fos-позитивных нейронов в СА1-зоне гиппокампа по сравнению с контрольной группой животных (рис. 3).

За счет регуляции экспрессии генов раннего реагирования c-fos и антиапоптотического белка bcl-2 Цереброкурин способен в определенной степени влиять на процессы апоптотической гибели нейрона. Это подтверждается нашим исследованием содержания антиапоптотического белка bcl-2 в СА1-зоне гиппокампа. Вве-

дение нейропептидов увеличивало количество bcl-2 белка в СА1-зоне гиппокампа по сравнению с контрольной группой животных ($p \leq 0,01$) (рис. 4).

Способность Цереброкурина регулировать экспрессию гена c-fos является одним из главных звеньев его церебропротективного действия — за счет нормализации экспрессии гена c-fos изменялся морфологический тип гибели нейронов, переключаясь на более «мягкий» апоптотический путь. Апоптотическая гибель нейронов является оптимальным, упорядоченным процессом прекращения жизнедеятельности деструктивно измененных нейронов, при котором стабилизируются клеточные мембраны, содержание клеток утилизируется путем образования апоптотических телец и их фагоцитоза.

Вопрос о значении апоптоза в условиях ишемии головного мозга остается спорным, однако все больше фактов свидетельствует в его пользу. В отличие от апоптоза некроз клетки — более грубое разрушение, которое сопровождается вакуолизацией, резким набуханием клетки, лизисом мембран, выходом клеточного содержимого в межклеточное пространство. Это сопровождается усилением синтеза воспалительных интерлейкинов и цитокинов, развитием воспаления. В зависимости от степени экспрессии ген c-fos регулирует процессы апоптоза/некроза.

Снижение явлений митохондриальной дисфункции в условиях ишемической патологии головного мозга, нормализация энергетического обмена нейронов при введении Цереброкурина обеспечивали и сохранность основных морфофункциональных характеристик нейронов сенсомоторной коры (табл. 2; рис. 5). Так, наблюдалось увеличение по сравнению с группой нелеченных животных плотности нейронов и их площади, свидетельствующее об уменьшении нейрональной гибели. Также в эти сроки наблюда-

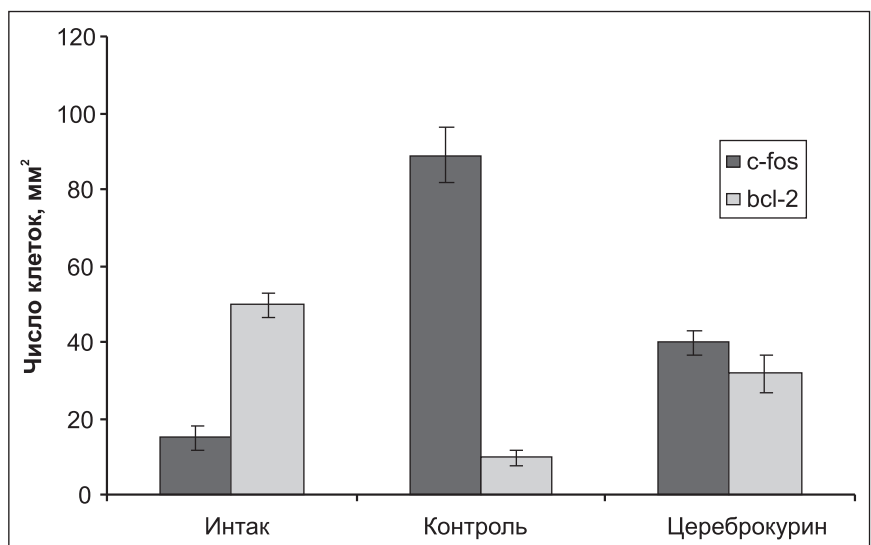


Рисунок 4. Влияние Цереброкурина на экспрессию генов раннего реагирования c-fos и антиапоптотического белка bcl-2 в условиях ОНМК

Таблица 2. Влияние Цереброкурина на морфофункциональные характеристики нейронов 5-го слоя сенсомоторной коры головного мозга крыс с ОНМК на 21-е сутки

Экспериментальные группы животных	Плотность нейронов, клетки/мм ²	Площадь тел нейронов, мкм ²	Содержание РНК в нейронах, ед. опт. плотности
Интакт	1292 ± 34	74,87 ± 1,32	9,72 ± 0,14
Контроль (ишемия)	980 ± 19	51,70 ± 1,08	5,1 ± 0,3
Ишемия + Цереброкурин	1277 ± 22*	70,82 ± 0,72*	9,87 ± 0,17*

Примечание: * — $p \leq 0,05$ по отношению к контролю.

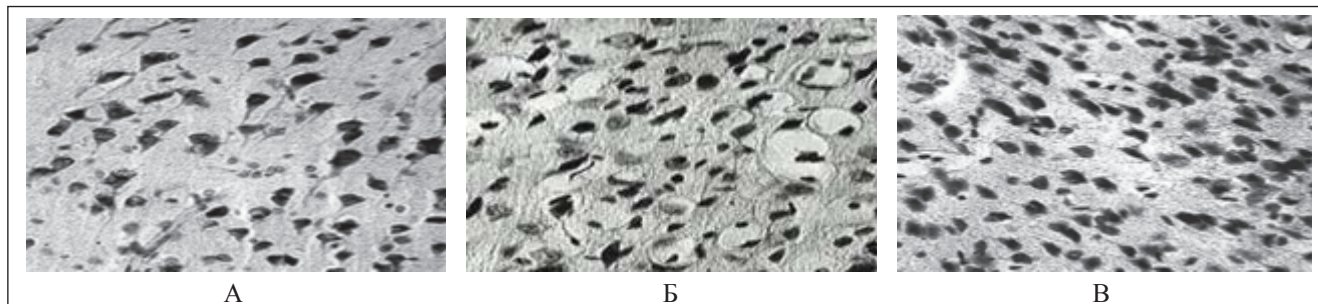


Рисунок 5. Нейроны сенсомоторной коры животных интактной группы (А), у крыс с ишемией (Б) и введением Цереброкурина (В) на 21-е сутки эксперимента (окраска галлоцианин-хромовыми квасцами, увеличение в 100 раз)

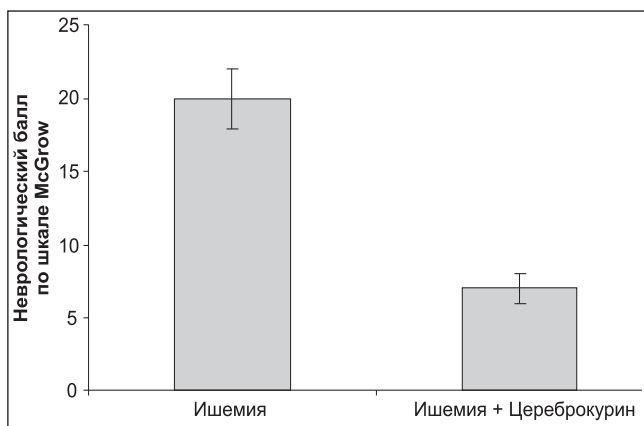


Рисунок 6. Влияние Цереброкурина на неврологическую симптоматику животных с ОНМК

лось увеличение содержания РНК в нейронах сенсомоторной коры, свидетельствующее о стимуляции транскрипционной и трансляционной активности в клетках под действием Цереброкурина.

Церебропротективное действие Цереброкурина проявлялось снижением неврологической симптоматики по шкале McGrow (рис. 6).

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали высокую церебропротективную активность Цереброкурина. Важным звеном механизма церебропротективного действия Цереброкурина является его нормализующее влияние на митохондриальную дисфункцию и энергообмен.

Литература

1. Андреев Б.В. Ноотропные средства // Мир медицины. — 1998. — № 8. — С. 25-28.
2. Беленічев І.Ф., Губський Ю.І., Левицький Є.Л. Основні шляхи формування активних форм кисню

норме і при ішемічних патологіях // Совр. пробл. токсикол. — 2004. — № 2. — С. 8-16.

3. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // Усп. физиол. наук. — 2003. — 34, № 3. — С. 21-34.

4. Горбунов Н.В. Активация образования окиси азота, опосредованная метаболитами глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток-зерен мозжечка // Бюл. exper. биол. и мед. — 1995. — № 7. — С. 40-48.

5. Губський Ю.І., Беленічев І.Ф., Левицький Є.Л., Галіця В.В., Бухтіярова Н.В., Коваленко С.І. Антиоксидантна активність конденсованих похідних [1,2,4]-триазинонів в умовах нітрозуючого стресу // Укр. біохім. журн. — 2007. — 79, № 5. — С. 159-164.

6. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. — М.: Медицина, 2001. — 328 с.

7. Завалишин И.А. Гибель нейрона — кардинальная проблема неврологии и психиатрии // Вестн. РАМН. — 1999. — № 1. — С. 28-34.

8. Евтушенко О.С. Результаты проведения клинической апробации препарата Цереброкурин в Донецком областном детском клиническом центре нейрореабилитации детей с органическими заболеваниями ЦНС // Цереброкурин. — Киев, 2006. — С. 23-34.

9. Поварова О.В., Городецкая Е.И., Медведев О.С. Антиоксиданты как нейропротекторы при ишемическом инсульте // Экспер. и клин. фарм. — 2003. — 66, № 3. — С. 69-73.

10. Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М. Регуляторная роль митохондриальной дисфункции при гипоксии и ее взаимодействие с транскрипционной активностью // Вестн. РАМН. — 2007. — № 2. — С. 3-13.

11. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ: Монография. — Волгоград: Семь ветров, 1999. — 640 с.

12. Харкевич Д.А. Основные направления создания новых лекарственных средств // Экспер. и клин. фарм. — 2003. — 66, № 3. — С. 74-79. □