

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦЕРЕБРОКУРИНА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТРОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, В. В. Дунаев<sup>1</sup>

Курсовое введение цереброкурина и церебролизина монгольским песчанкам с острым нарушением мозгового кровообращения на 4-е сутки приводило к снижению явлений митохондриальной дисфункции, что выражалось в их способности тормозить открытие митохондриальной поры, нормализовать энергетический метаболизм, повышать экспрессию раннего гена *c-fos*. Кроме того, цереброкурин восстанавливал морфофункциональное состояние нейронов, а также способствовал переключению гибели клеток с некроза на апоптоз. Цереброкурин по всем изучаемым показателям статистически достоверно превышал таковые церебролизина

**Ключевые слова:** острое нарушение мозгового кровообращения, митохондриальная дисфункция, нейропептиды, ген *c-fos*

### ВВЕДЕНИЕ

Отмеченный в последние годы рост сосудистых заболеваний обусловил увеличение частоты острых нарушений мозгового кровообращения. Среди видов инсульта преобладают ишемические поражения мозга, по данным международных мультицентровых исследований соотношение ишемического и геморрагического инсультов составляет в среднем 5 – 5,5:1, то есть 80 – 85 и 15 – 20 % [3, 8].

Данные обстоятельства обуславливают актуальность дальнейшего поиска эффективных нейропротекторов, а также изучения патогенетических механизмов развития церебральной ишемии.

В последнее время активно ведется поиск эффективных нейропротекторов среди нейропептидов. Открытие нейротрофических пептидных факторов привело к формированию новой стратегии фармакотерапии — пептидергической, или нейротрофической терапии нейродегенеративных заболеваний. На этой основе был разработан церебролизин, успешно применяемый в терапии большого спектра неврологических расстройств. Однако церебролизин не всегда эффективен при остром ишемическом инсульте, часто оказывает ГОМК-подобное действие на функциональное состояние мозга, замедляя течение восстановительных процессов. В последнее время в клинике появился новый нейропептидный препарат 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, в частности, от церебролизина. Цереброкурин содержит пептиды, несущие в себе программу анализа состояния и “строительства” ЦНС. Таким образом, конечный эффект различается из-за качественно отличного механизма действия. Наряду с этим цереброкурин увеличивает аффинность связывания BDNF с его рецепторами [6]. В экспериментальных исследованиях выявлена способность цереброкурина предотвращать гиперактивацию микроглии и снижать продукцию ИЛ-1 $\alpha$  и других провоспалительных цитокинов, что отражает влияние препарата на выраженность местной воспалительной реакции и процессов оксидантного стресса в ишемизированной зоне мозга [7].

Однако механизмы действия данного препарата требуют дополнительного изучения. В частности, не установлена способность цереброкурина влиять на процессы нейродеструкции, инициаторами которой являются митохондриальная дисфункция и гиперэкспрессия ранних генов (*c-fos*).

Целью настоящего исследования явилось изучение нейропротекторного эффекта цереброкурина в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) по его влиянию на процессы митохондриальной дисфункции, энергетический метаболизм, экспрессию раннего гена *c-fos*, тип гибели нейрональной клетки.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на монгольских песчанках (*Meriones unculatus*) массой 70 – 90 г, которые часто используются для моделирования нарушения мозгового кровообращения, что обусловлено разединением большого круга кровообращения, слабо развитой системой коллатерального кровообращения. Нарушение мозгового кровообращения вызывали необратимой односторонней перевязкой сонной артерии. Це-

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии и медицинской рецептуры (зав. — проф. И. Ф. Беленичев) Запорожского государственного медицинского университета, Украина, Запорожье, 69035, пр. Маяковского, 26.

реброкурин<sup>2</sup> и церебролизин<sup>3</sup> вводили внутривентрикулярно сразу после выхода животных из наркоза, один раз в сутки в течение 4 дней. На 4-е сутки животных выводили из эксперимента под этиминал-натриевым наркозом путем декапитации [10].

Выделенное ишемизированное полушарие головного мозга тщательно промывали охлажденным 0,9 % раствором KCl (4 °C), измельчали и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды: сахарозы — 250 мМ; трис HCl-буфера — 20 мМ, ЭДТА — 1 мМ (pH 7,4). Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин при 700 g (4 °C). Затем супернатант центрифугировали повторно 15 мин при 11000 g (4 °C). Митохондрии суспендировали в небольшом объеме среды выделения, не содержащей ЭДТА, и хранили на льду. Образование поры, вызванное набуханием митохондрий, регистрировали спектрофотометрически при 540 нм ( $A_{540}$ ). Открытие митохондриальной поры инициировали путем добавления в суспензию митохондрий избытка глутамата и кальция [1].

Для оценки биоэнергетических процессов в гомогенате головного мозга хромотографически определяли АТФ, АДФ, АМФ [4].

Для морфометрических и гистоиммунохимических исследований головной мозг фиксировали в 10 % жидкости Буэна (24 ч) и по стандартной схеме заливали в парафиновые блоки, из которых готовили серийные фронтальные 5-микронные гистологические срезы в области постцентральной извилины (соматосенсорная кора). Для изучения морфофункционального состояния нейронов IV – V слоев коры гистологические срезы депарафинировали по стандартной методике и окрашивали галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону. Изображение коры мозга получали на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) и с помощью 8-битной CCD-камеры СОНУ-4922 (СОНУ Inc., США) вводили в компьютерную систему анализа изображений VIDAS-386 (“Kontron Elektronik”, Германия). Морфометрический анализ клеток мозга осуществляли в автоматическом режиме с помощью макро-программы, разработанной в специализированной среде программирования VIDAS-2.5 (“Kontron Elektronik”, Германия) [12]. Определяли следующие показатели: плотность нейронов, глиальных клеток, площадь тел нейронов; концентрацию РНК в нейронах (единицы оптической плотности,  $E_{оп}$ ), которые рассчитывали как логарифм отношения оптической плотности тела клетки к оптической плотности межклеточного вещества.

<sup>2</sup> Состав: 2 мл раствора для инъекций содержит комплекс свободных аминокислот, пептидов и низкомолекулярных продуктов контролируемого протеолиза белков головного мозга эмбрионов крупного рогатого скота; производитель: ООО “НИР”, Украина, Киев.

<sup>3</sup> Состав: 1 мл раствора для инъекций содержит 215,2 мг комплекса пептидов, полученных из мозга свиньи; производитель “Ebewe”, Австрия.

Количество *c-fos*-положительных нейронов определяли иммуногистохимическим методом непрямой флюоресценции. На срезы наносили первичные антитела к белку *c-fos* (“Sigma Chemical”, США) и инкубировали при 4 °C 24 ч. После инкубации срезы трижды промывали 0,1 М фосфатным буфером. Затем на образцы наносили вторичные антитела (флюоресцент конъюгированный козий IgG, “Sigma Chemical”, США) и инкубировали при комнатной температуре 60 мин. После инкубации срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером. На флюоресцентном микроскопе Axioskop исследовали *fos*-иммунопозитивные нейроны [14].

Для определения количества апоптирующих и некротических нейроцитов суспензию нейронов, выделенных из головного мозга экспериментальных животных, окрашивали одновременно двумя флюоресцентными красителями Hoechst 33342 (апоптоз) и этидиума бромидом (некроз). Некротическими считали большие красные клетки, апоптическими — зеленые с фрагментированными ядрами [9].

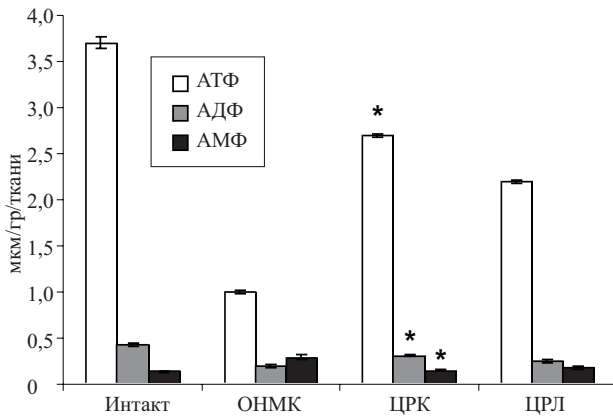
Отличия между группами оценивали статистически с использованием параметрического критерия *t*-Стьюдента с помощью программы Biostat и MS Excell. Значимость отличий относительных величин оценивали с применением критерия  $\chi^2$ . Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95 % ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что курсовое назначение цереброкурина (0,001 мл/100г массы) и церебролизина (0,012 мл/100г массы) приводило к нормализации энергетического обмена, дефицит которого был отмечен в группе животных с ОНМК. Так, на 4-е сутки в группах, получавших цереброкурин, восстанавливалась продукция энергии, о чем свидетельствовало повышение по сравнению с группой нелеченых животных АТФ и АДФ. Из рис. 1 видно, что по исследуемым показателям цереброкурин значимо превышал показатели церебролизина.

Подобное энерготропное действие исследуемых препаратов объясняется их позитивным влиянием на процессы митохондриальной дисфункции в условиях ОНМК. Так, выявлена способность цереброкурина более выражено, в отличие от церебролизина, тормозить открытие митохондриальной поры на 4-е сутки модельной патологии (рис. 2).

Способность цереброкурина тормозить открытие митохондриальной поры, по нашему мнению, является ключевым моментом в механизме его действия. Из наших ранних исследований, а также по данным литературы, развитие митохондриальной дисфункции приводит к нарушению обратного захвата медиаторов (катехоламинов, дофамина, серотонина); нарушению ионного транспорта, генерации и проведения импульса; нарушению синтеза белка *de novo*; нарушению

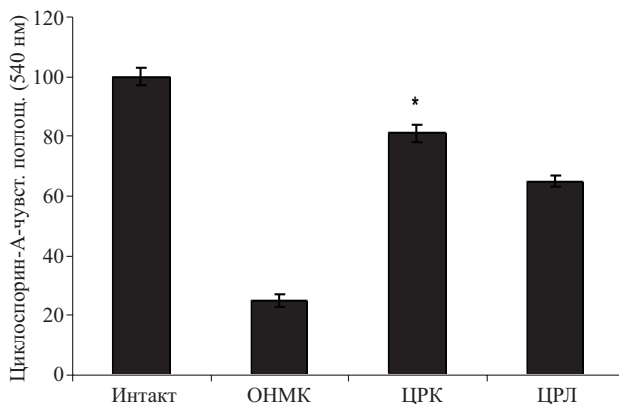


**Рис. 1.** Влияние препаратов на энергетический метаболизм в головном мозге животных с ОНМК на 4-е сутки.

Здесь и на рис. 2–4: ЦРК — цереброкурин, ЦРЛ — церебролизин. \* —  $p \leq 0,05$  по отношению к церебролизину.

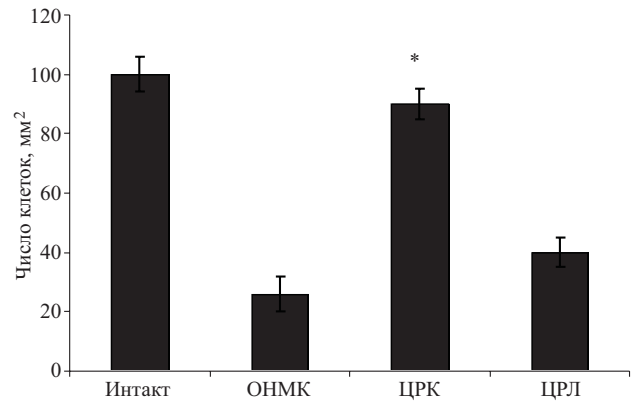
процессов трансляции и транскрипции; активизации “паразитарных” энергопродуцирующих реакций, что приводит к существенной убыли энергетических запасов нейрональной клетки и ее гибели. Открытие пор превращает митохондрии из “электростанций” в “топку” субстратов окисления без образования АТФ. В точных биохимических исследованиях 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 и инициирует митоптоз [2].

С явлением митохондриальной дисфункции тесно связана гиперэкспрессия ранних генов *c-fos*. Известно, что белок *c-fos* непосредственно участвует в процессах фрагментации митохондриальной ДНК и является инициатором процессов нейрональной гибели. Характер экспрессии данного гена определяет тип гибели нейрона: апоптоз/некроз. В случае значительного сни-



**Рис. 2.** Влияние препаратов на открытие митохондриальной поры нейронов крыс с ОНМК (4-е сутки).

Обозначения те же, что на рис. 1.

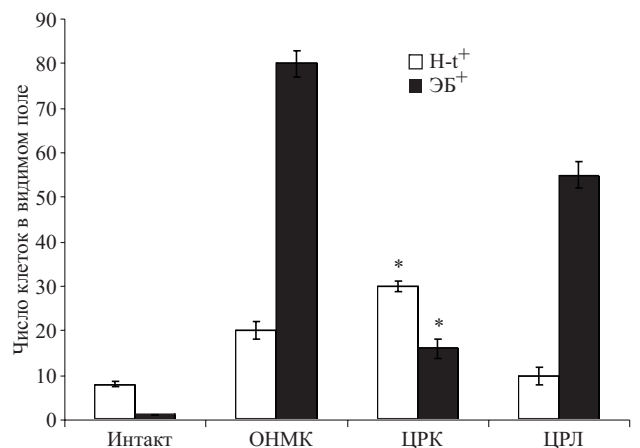


**Рис. 3.** Влияние исследуемых препаратов на характер экспрессии гена *c-fos* в IV – V слое коры большого мозга животных с ОНМК на 4-е сутки.

Обозначения те же, что на рис. 1.

жения гена *c-fos* клетка погибает некротически [13]. Лечебно-профилактическое назначение цереброкурина животным с ОНМК приводило к достоверному повышению ( $p \leq 0,01$ ) числа *fos*-позитивных нейронов IV – V слоев коры головного мозга по сравнению с контрольной группой животных. Как видно из рис. 3, церебролизин на исследуемый показатель влияния не оказывал, что связано, по нашему мнению, с отсутствием у него ростовых факторов.

За счет подавления экспрессии генов раннего реагирования *c-fos* цереброкурин способен в определенной степени влиять на тип гибели нейрона в условиях ОНМК, переключая его с некроза на апоптоз. Апоптотическая гибель нейронов является оптимальным, упорядоченным процессом прекращения жизнедеятельности деструктивно измененных нейронов, при котором стабилизируются клеточные мембраны, содержимое клеток утилизируется путем образования апоптотических телец и их фагоцитоза без развития воспалительной реакции [11]. Из рис. 4 видно, что при



**Рис. 4.** Влияние цереброкурина и церебролизина на тип морфологической гибели клеток у животных с ОНМК на 4-е сутки.

$N-t^+$  — Hoechst-положительные нейроны,  $EB^+$  — Этидиума бромид-положительные нейроны. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

окраске Hoechst 33342 (апоптоз) и этидиума бромидом (некроз) суспензии нейроцитов, выделенных из головного мозга крыс, получавших цереброкурин, преобладал апоптотический тип гибели нейронов, что проявлялось снижением количества некротирующих нейронов (положительная окраска этидиума бромидом) с преобладанием апоптирующих нейронов. При введении церебролизина наблюдалось общее снижение деструктивных клеток, однако, с преобладанием некротического типа гибели нейронов.

Нейропротекторное действие исследуемых препаратов в условиях ОНМК проявлялось восстановлением плотности нейронов, увеличением площади тел нейронов, а также нормализацией морфофункционального состояния нейронов (увеличение количества РНК). По исследуемым показателям нейропротекторное действие цереброкурина было более выражено, чем в группе животных, получавших церебролизин (таблица).

## ВЫВОДЫ

1. Моделирование острого нарушения мозгового кровообращения у монгольских песчанок приводило к развитию митохондриальной дисфункции нейронов, нарушению продукции и транспорта энергии, снижению экспрессии раннего гена *c-fos*, уменьшению плотности нейронов, их площади, содержания в них РНК.

2. Курсовое назначение цереброкурина (0,001 мл/100 г массы) и церебролизина (0,012 мл/100 г массы) животным с ОНМК уменьшало явления митохондриальной дисфункции, что выражалось в их способности тормозить открытие митохондриальной поры, восстановлению макроэргов в клетке и нормализации морфофункциональных характеристик нейронов. По исследуемым показателям цереброкурин превышал показатели церебролизина.

3. Цереброкурин повышал экспрессию гена *c-fos*, церебролизин на характер экспрессии гена *c-fos* влияния не оказывал.

4. Цереброкурин на 4-е сутки ОНМК способствовал “переключению” некротического типа гибели нейро-

## Влияние препаратов на морфофункциональные характеристики нейронов сенсорной зоны (IV – V слои) коры большого мозга крыс с экспериментальной ишемией на 4-е сутки

Группа животных	Плотность нейронов, клетки/мм <sup>2</sup>	Площадь тел нейронов, мкм <sup>2</sup>	Содержание РНК в нейронах, E <sub>оп</sub>
Интактные	1292 ± 34	74,87 ± 1,32	9,72 ± 0,14
Контроль (ОНМК)	980 ± 19	51,7 ± 1,08	5,1 ± 0,3
ОНМК + цереброкурин	1307 ± 9*	70,82 ± 0,72**	9,17 ± 0,17**
ОНМК + церебролизин	1000 ± 11*	60,12 ± 0,94*	6,49 ± 0,28*

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

\*\* —  $p \leq 0,05$  по отношению к цереброкурину.

нов на более “мягкий” апоптотический. При назначении церебролизина значимых отличий отмечено не было.

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. В. Акопова, В. Ф. Сагач, *Укр. биохим. журн.*, **1**(76), 48 – 55 (2004).
2. И. Ф. Беленичев, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов и др., *Международ. неврол. журн.*, **4**, 23 – 29 (2008).
3. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, Е. Ю. Журавлева, *Межд. мед. журн.*, **1**, 54 – 51 (1999).
4. Н. Б. Захарова, В. И. Рубин, *Лаб. дело*, **12**, 735 – 738 (1980).
5. В. Ю. Рыбников, Н. Г. Закуцкий, *Пептидная регуляция функций мозга*, Стела, СПб (2000).
6. А. Н. Сергиенко, *Новости медицины и фармации*, **12**(97), 8 (2001).
7. Сиротюк А. К., *Новости медицины и фармации*, **18**(158), 13 (2004).
8. В. И. Скворцова, *Вестн. РАМН*, **11**, 74 – 81 (2003).
9. А. А. Скородец, Л. В. Стаховская, А. А. Белкин, *Журн. неврол. и психиатр.*, **22**, 32 – 38 (2008).
10. А. В. Стефанов, *Доклинические исследования лекарственных средств (методические рекомендации)*, Авиацина, Киев (2002).
11. R. J. Carmody and T. G. Cotter, *Redox Rep.*, **6**, 77 – 90 (2001).
12. Y. M. Kolesnik and A. V. Abramov, *Microscopy and Analysis*, **5**, 12 – 16 (2002).
13. M. Schorpp-Kistner and P. Herrlich, *Oncogene.*, **20**, 29 – 52 (2001).
14. E. Tulchinsky, *Histol. Histopathol.*, **3**, 921 – 928 (2000).

Поступила 18.06.09

## NEUROPROTECTOR EFFECT OF CEREBROCURIN UNDER ACUTE CEREBRAL STROKE MODEL CONDITIONS

I. F. Belenichev, S. V. Pavlov, and V. V. Dunaev,

Zaporozhye State Medical University, pr. Mayakovskogo 26, 69035, Zaporozhye, Ukraine

Chronic administration of cerebrocurin and cerebrolysin to Mongolian jirds with acute cerebral stroke model led to a decrease in the mitochondrial dysfunction on the 4th day, which was manifested by their ability to inhibit the mitochondrial permeability transition pore opening, normalize the energy metabolism, and enhance *c-fos* gene expression. In addition, cerebrocurin restored the morphofunctional state of neurons and favored the cell loss mechanism switching from necrosis to apoptosis. With respect to all characteristics under consideration, the effect of cerebrocurin exceeded with statistical confidence that of cerebrolysin.

**Key words:** Acute cerebral stroke, mitochondrial dysfunction, neuropeptides, *c-fos* gene