

КОРТЕКСИН (НЕЙРОПРОТЕКЦИЯ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ)

О.К. Гранстрем^{1,2}, Е.Г. Сорокина³, М.А. Салыкина³, Т.П. Сторожевых³,
А.М. Сурин³, Г.В. Штучная⁴, В.П. Реутов³, А.Л. Крушинский⁵,
В.С. Кузенков⁵, В.Г. Пинелис³, М.М. Дьяконов²

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

² ООО «ГЕРОФАРМ», Санкт-Петербург, ³- Научный центр здоровья детей РАМН, Москва

⁴- ОАО «Национальные биотехнологии», Оболенск, ⁵- МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

CORTEXIN: NEUROPROTECTION AT THE MOLECULAR LEVEL

O.K. Granstrem^{1,2}, E.G. Sorokina³, M.A. Salykina³, T.P. Storozhevykh³,
A.M. Surin³, G.V. Shtuchnaya⁴, V.P. Reutov⁵, A.L. Krushinsky⁶,
V.S. Kuzenkov⁶, V.G. Pinelis³, M.M. Dyakonov²

¹ St. Petersburg State Medical University n.a. acad. Pavlov, ² ООО "GEROPHARM", St. Petersburg

³ Scientific Center of Child Health, RAMS, Moscow, ⁴ JSC "National Biotechnology", Obolensk

⁵ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, ⁶ Moscow State University

В статье анализируются множественные эффекты кортексина, затрагивающие каскадную регуляцию апоптоза, экспрессию нейротрофических факторов, энергетическое обеспечение нервной клетки и митохондриальный потенциал, функционирование рецепторов глутамата и регулирование концентрации кальция в клетке, что выражается в нейропротекторном и нейротрофическом действии препарата.

Представлены данные литературы и собственных исследований нейропротективного и нейротрофического действия препарата. Сбалансированность пептидов Кортексина, их четкая «адресность» очагу поражения и представленные выше молекулярные механизмы действия препарата объясняют не только терапевтическую эффективность, но и отсутствие побочного действия препарата.

The paper analyzes the effects of multiple cortexin affecting the cascade regulation of apoptosis, expression of neurotrophic factors, the energy supply of the nerve cell and mitochondrial potential, as well as the functioning of glutamate receptors and the regulation of Ca²⁺ concentration in the cell. We discuss both literature data and own research results related to the neuroprotective and neurotrophic action of this drug. Balance peptides cortexin, their clear «targeting» lesion focus and presented above the molecular mechanisms of drug action is explained not only therapeutic efficacy, but also the absence of side effects of the drug.

Введение

В настоящее время считается установленным, что ишемия мозга, нейродегенеративные заболевания приводят к гемодинамическим, биохимическим и нейрофизиологическим изменениям, которые могут клинически проявляться нарушениями поведения и различными патологическим расстройствами. Нарушения функциональной нейрональной активности, прежде всего, связаны с уменьшением мозгового кровотока, и по мере ее прогрессирования происходит снижение метаболической активности, которая определяет структурные изменения нейронов и глии [11]. Основными механизмами повреждения нейро-

нов при ишемии мозга или нейродегенеративных заболеваниях являются глутамат-опосредованная эксайтотоксичность, кальциевая перегрузка нейронов, окислительный стресс, и некоторые другие механизмы. Отсюда и становится актуальным поиск лекарственных средств, обладающих доказанным избирательным регулирующим воздействием и направленных на защиту нейрона при патологических состояниях. Имеющиеся в литературе данные отличаются большой противоречивостью. Так, публикация обзорно-аналитического исследования «1,026 Experimental Treatments in Acute Stroke» [13] приве-

ла к искаженной трактовке полученных результатов. Действительно, авторы показали, что ни для одного из проверенных 144 потенциальных нейропротекторов из группы в 1026 субстанций не была доказана эффективность у человека, несмотря на обнадеживающие результаты, полученные ранее в экспериментах на животных. Поэтому очевидно, что дальнейший поиск новых эффективных нейропротекторов представляет собой сложный процесс, требующий объединенных усилий врачей, биологов и фармакологов на всех этапах. В этом отношении особого внимания заслуживают препараты с пептидной структурой. Несмотря на разнообразие, их объединяет ряд общих характеристик: низкая дозировка, отсутствие выраженных токсических эффектов, мягкость и пролонгированность воздействия. В целом континуум регуляторных пептидов организма [2], сформированный миллионами лет эволюции, является основой многоуровневой регуляции всех функций организма, в том числе и процессов, обеспечивающих нейропротекторный эффект. В информационном плане именно пептиды являются универсальным «языком», понятным и естественным для живых организмов как на системном, так и на клеточном уровне. Это обеспечивает вектор саногенеза живого организма.

В качестве иллюстрации успешной разработки, основанной на перечисленных принципах, рассмотрим Кортексин - препарат, эффективность которого доказана на клиническом, биологическом, клеточном, генетическом и молекулярном уровнях.

ОБЗОР ИССЛЕДОВАНИЙ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ КОРТЕКСИНА

Нейропротекторное противоапоптотное действие. Основной мишенью Кортексина является зона пенумбры - участок нервной ткани, окружающей очаг поражения, испытывающей кислородное и энергетическое голодание, но какое-то время (считается, что в течение 5–6 ч после катастрофы) еще живой. От эффективности терапевтических мероприятий в этот период зависит дальнейшее развитие болезни: либо подавление апоптоза и некроза нейронов, восстановление их жизнеспособности и остановка каскада патологических реакций, либо расширение очага поражения, замещение погибших нейронов глиальными клетками и, как следствие, существенный неврологический дефицит и сложности в реабилитации пациента [14]. Кортексин воздействует на все этапы патологической цепи молекулярных событий, приводящих к гибели нейронов. Показано, что препарат снижает уровень апоптоза нейронов, вызванного избыточным накоплением глутамата в синаптической щели и в результате этого гиперстимуляции глутаматных рецепторов (рис. 1, 2).

Восстановление синтеза АТФ в нейронах.

Центральным звеном всех патологических процессов, протекающих на фоне гипоксии, является уменьшение

содержания АТФ в нейронах мозга. Снижение синтеза и увеличение расхода АТФ показано сразу после стимуляции глутаматных рецепторов токсическими концентрациями глутамата [3]. Известно, что снижение концентрации АТФ в нейронах во время гиперстимуляции глутаматных рецепторов [3,5] может нарушить систему внутри- и межклеточной сигнализации в нейронах мозга, в частности, ионный гомеостаз, активность ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования, захват Ca^{2+} митохондриями и синтез белков. Эти процессы могут лежать в основе гибели нейронов после гипоксии и токсического действия избыточно присутствующего в синаптической щели глутамата. В недавних исследованиях показано, что Кортексин способен восстанавливать содержание АТФ после действия токсических концентраций глутамата в молодых и старых нейронах (рис.3).

Ингибирование отсроченной кальциевой дисрегуляции

Нейродеструктивное действие глутамата связано с необратимым повышением цитозольной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и деполяризацией митохондрий [7,12]. Развитие постглутаматного $[Ca^{2+}]_i$ плато является ключевым, поскольку при этом запускается каскад Ca^{2+} -зависимых внутриклеточных процессов, ведущих, в конечном счете, к гибели нейронов. В культивируемых нервных клетках мозжечка, гиппокампа и коры глутамат вызывает двухфазное повышение $[Ca^{2+}]_i$, причем вторая фаза сопряжена со снижением митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$). Как правило, клетки, в которых происходит коллапс $\Delta\Psi_m$, после отмены глутамата не восстанавливают базальный уровень $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ и в конечном итоге погибают (так называемая отсроченная кальциевая дисрегуляция) [7]. Развитие постглутаматного $[Ca^{2+}]_i$ плато является ключевым звеном в механизмах глутаматной эйкситотоксичности, поскольку запускается каскад Ca^{2+} -зависимых внутриклеточных процессов, ведущих, в конечном счете, к гибели нейронов. Исследования изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ методом флуоресцентной микроскопии демонстрируют, что Кортексин значительно замедляет развитие отсроченной кальциевой дисрегуляции при действии глутамата. Таким образом, применение Кортексина способно расширять «терапевтическое окно» при ишемическом поражении нервной ткани (рис. 4).

Нейротрофическое воздействие. Пептиды Кортексина оказывают прямое и опосредованное нейротрофическое воздействие на клетки, например, стимулируя рост нейритов (рис. 5) или снижая гибель нейронов, культивируемых в среде, лишенной ростовых факторов [4]. Основные механизмы этого влияния, вероятно, базируются на изменении экспрессии генов, регулирующих синтез собственных нейротрофических факторов, таких как мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и фактор роста

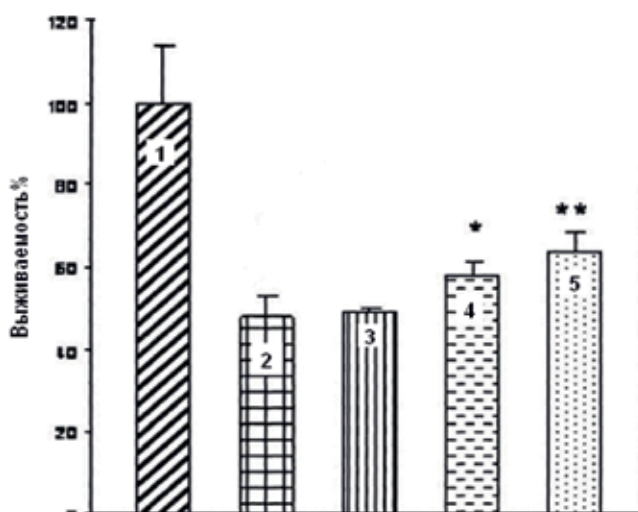


Рис. 1. Влияние Кортексина на выживаемость нейронов, подвергнутых токсическому глутаматному воздействию in vitro [3]:

1. Контроль; 2. 100 μM глутамата (в 0 Mg²⁺, 10 μM глицин-содержащем буфере); 3. 100 μM глутамата + 20 μg/ml кортексина; 4. 100 μM глутамата + 50 μg/ml кортексина; 5. 100 μM глутамата + 100 μg/ml кортексина. * p<0.05/

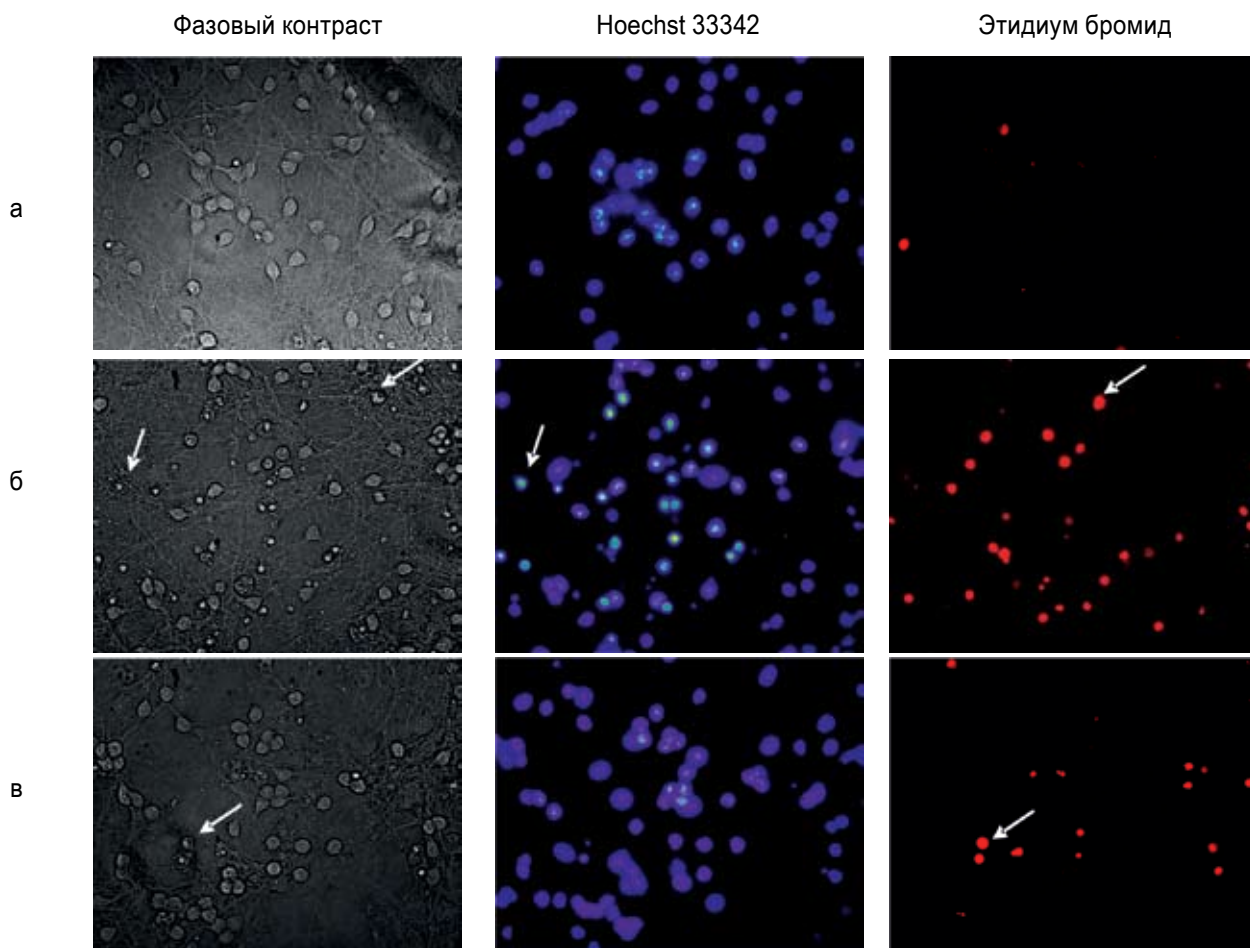


Рис. 2. Снижение апоптотической гибели нейронов при гиперстимуляции глутаматом. Изображения культуры зернистых нейронов мозжечка крысы, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 («Zeiss»). Клетки окрашены одновременно двумя флуоресцентными красителями: Hoechst 33342 (апоптоз) и этидиума бромидом (некроз).

а - контроль; б - глутамат; в - глутамат + Кортексин (100 нг/мл).

Стрелками отмечены апоптотические и некротические нейроны одновременно на флуоресцентном изображении (справа) и изображении в проходящем свете (слева) [5]

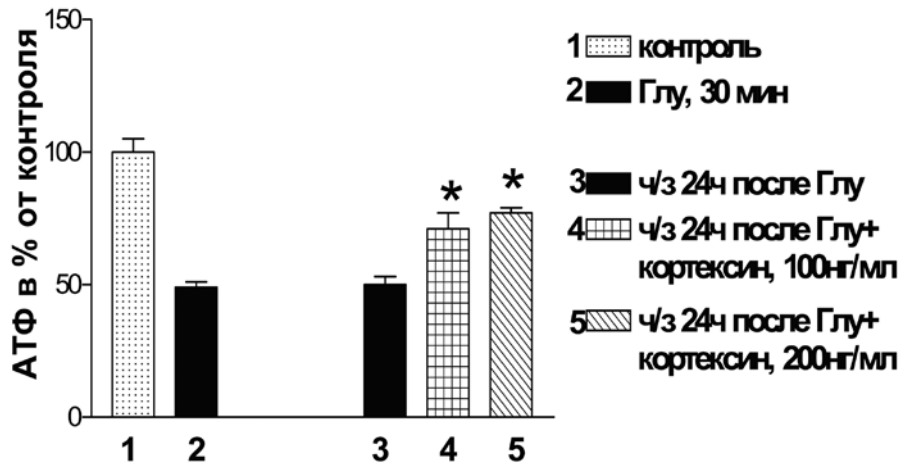


Рис. 3. Влияние Кортикостерона на восстановление АТФ в старых (14–15 сут) нейронах мозжечка.

1 — контроль (100% = 5,89 ± 1,4 нмоль/мг белка); 2 — глутамат (Глу) 100 мкмоль, 30 мин; 3 — через 24 ч после 30 мин действия 100 мкмоль глутамата (восстановительный период в NBM-среде); 4 — через 24 ч после 30 мин действия 100 мкмоль глутамата в присутствии 100 нг/мл Кортикостерона; 5 — то же, что и 4, но в присутствии 200 нг/мл Кортикостерона (Кортикостерон присутствовал в растворе в течение всего времени).

Данные представлены в $M \pm m$ значений, полученных в четырех экспериментах, общее число использованных культур для каждой точки 6–8. * — $p < 0,05$ по сравнению с 3 [7]



Рис. 4. Предварительная инкубация с Кортикостероном (100 нг/мл) в течение 24 ч замедляет развитие отсроченной кальциевой дисрегуляции в нейронах мозжечка крысы в ответ на действие глутамата (Сторожевых Т. П., 2008)



Рис. 5. Кортикостерон стимулирует рост нейритов в органотипической культуре коры головного мозга эмбриона цыпленка: а — контроль; б — Кортикостерон

Таблица 1

Влияние кортексина на судорожную активность и выживаемость крыс линии Крушинского-Молодкиной в условиях акустического стресса

| | Частота нарушений движений, % | | | Смертность, % | Латентный период, сек |
|---|-------------------------------|-----------|-----------|---------------|-----------------------|
| | Легкие | Средние | Тяжелые | | |
| Контроль n=13 | 0±0 | 46,2±13,8 | 53,8±13,8 | 15,4±4,0 | 2,7±0,2 |
| кортексин 0,2мг/1000г n=13 | 30,8±12,8 | 30,8±12,8 | 38,4±13,5 | 7,3±3,0 | 4,3±0,4 |
| достоверность кортексин/контроль (p) | p<0,01 | н.д. | н.д. | p<0,01 | p<0,05 |

Таблица 2

Действие кортексина на профиль IgG и IgM аутоантител к GluR1 субъединице AMPA рецепторов глутамата у крыс линии Крушинского-Молодкиной после звукового стресса

| Группы крыс | IgG аАТ (в Е.О.П.) M±m | IgM аАТ (в Е.О.П.) M±m |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Контроль (0,9% NaCl) (n=13) | 0,450±0,016 | 0,703±0,015 |
| Кортексин (n=13) | 0,373±0,018* | 0,657±0,029 |

* -p<0.05 с контрольной группой

Таблица 3

Действие кортексина на профиль IgG и IgM аутоантител к NR2 субъединице NMDA рецепторов глутамата у крыс линии Крушинского-Молодкиной после звукового стресса

| Группы крыс | IgG аАТ (в Е.О.П.) M±m | IgM аАТ (в Е.О.П.) M±m |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Контроль (0,9% NaCl) (n=13) | 0,334±0,106 | 1,727±0,094 |
| Кортексин (n=13) | 0,184±0,031** | 0,959±0,085*** |

, * -p<0.01 и 0,001 с контрольной группой

нервов (NGF) [10]. Результаты клинических исследований также свидетельствуют о влиянии Кортексина на цитокиновый обмен. Препарат, возможно, через систему противовоспалительных цитокинов улучшает нейротрофическое обеспечение нервного волокна и уменьшает аутоиммунную агрессию, способствуя восстановлению и росту аксонов [1].

Эффекты кортексина у крыс с наследственной эпилепсией и геморрагическими инсультами. В настоящее время считается, что количество больных эпилепсией составляет около 1% населения [6]. Примерно 40% страдающих этим заболеванием людей поддаются медикаментозному лечению. Для изучения влияния фармакологических препаратов, в том числе и пептидного препарата кортексин, обладающего нейропротекторным действием, нередко используют экс-

периментальные модели эпилепсии, вырабатываемые у животных. Наиболее перспективным представляется использование наследственных моделей эпилепсии на животных. Особенно хорошо изучена в этом отношении наследственная аудиогенная эпилепсия у крыс линии Крушинского-Молодкиной, выведенная в 1947 г. в Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова.

В результате предварительного использования кортексина были получены данные, показывающие, что кортексин способствует лучшей адаптации к звуковому стрессу, снижению судорожной активности, и существенному повышению выживаемости этих животных (таблица 1).

Контрольные животные и животные, получавшие пептид кортексин, в 2 раза различались по смертности. В группе контрольных животных смертность

составляла 15,4%, а в группе животных с 10-дневным введением кортексина 7,3% ($p < 0,5$). Показано также, что при введении кортексина у животных, подвергнутых стрессу, увеличивается латентный период до развития судорог, а в структуре нарушения движений преобладают легкие нарушения.

Полученные данные указывали, что кортексин оказывает защитное действие на крыс, генетически предрасположенных к геморрагическому инсульту, уменьшая смертность и нарушения двигательной активности. Это, в свою очередь, может способствовать снижению риска развития геморрагических повреждений.

В работах Дамбиновой С.А. и ее коллег было показано, что в крови больных с судорожными синдромами и нарушениями мозгового кровообращения наблюдается увеличение содержания аАТ к рецепторам глутамата (Glu) – субъединице GluR1 AMPA-рецепторов и субъединице NR2 NMDA-рецепторов [8,9]. В настоящей работе мы определили содержание аАТ к рецепторам глутамата у крыс линии К-М до после введения кортексина. Результаты определения содержания аАТ к AMPA- и NMDA-рецепторам Glu в сыворотке крови экспериментальных животных представлены в таблицах 2 и 3. Во всех группах животных (контрольной и подопытной) после звукового стресса в сыворотке крови преобладали аАТ класса IgM. Это было характерно как для аАТ к AMPA(GluR1), так и для аАТ к NMDA(NR2A) рецепторам Glu. Увеличение концентрации аАТ IgM класса свидетельствовало о включении в аутоиммунный ответ иммуноглобулинов быстрого реагирования, что может быть характерным для процесса воспаления, развивающегося при мозговых кровоизлияниях. Количественный анализ аАТ выявил, что у животных с предварительным введением кортексина имеется снижение аАТ как к AMPA, так и к NMDA рецепторам Glu, причем уменьшение содержания аАТ к NMDA-рецепторам было более выражено, чем к AMPA-рецепторам, что свидетельствовало о возможности кортексина снижать гипоксические повреждения мозга во время судорог. При введении кортексина у животных уменьшалось также содержание аАТ IgM класса, что наиболее вы-

раженно проявлялось при исследовании уровня аАТ к NMDA –типу рецепторов Glu. Эти данные указывали на способность кортексина снижать развитие воспаления при геморрагическом инсульте.

Итак, анализ полученных данных свидетельствует о том, что кортексин оказывает защитное действие на крыс, генетически предрасположенных к эпилепсии и геморрагическому инсульту, снижая нарушения двигательной активности и уменьшая смертность животных. У животных с предварительным введением кортексина снижается содержание в сыворотке крови аАТ как к AMPA, так и к NMDA рецепторам Glu, причем уменьшение содержания аАТ наиболее проявляется для аАТ IgM класса, направленных против NMDA-рецепторов Glu. Это, в свою очередь, говорит о том, что введение кортексина способно уменьшить как гипоксические повреждения нейронов, так и воспалительный процесс в ткани мозга.

Выводы:

1. Многочисленные независимые исследования убедительно доказывают наличие у Кортексина множественных эффектов, затрагивающих каскадную регуляцию апоптоза, экспрессию нейротрофических факторов, энергетическое обеспечение нервной клетки и митохондриальный потенциал, функционирование рецепторов глутамата и регулирование концентрации кальция в клетке, что выражается в нейропротекторном и нейротрофическом действии препарата.

2. Представленные новые данные о механизме действия Кортексина объясняют его широкую терапевтическую эффективность у пациентов с различными поражениями головного мозга с первых дней жизни до старческого возраста.

3. Сбалансированность пептидов Кортексина, их четкая «адресность» очагу поражения и представленные выше молекулярные механизмы действия препарата объясняют не только терапевтическую эффективность, но и отсутствие побочного действия препарата. Последнее обстоятельство заметно выделяет Кортексин из всего списка ноотропов, нейропротекторов и антиоксидантов.

Литература

1. Герасимова М.М., Петушков А.Ю. Влияние Кортексина на цитокиновый обмен при пояснично-крестцовых радикулопатиях. *Нейроиммунология* 2004; 2 (2): 26.
2. Королева С.В., Ашмарин И.П.. Разработка и применение экспертной системы анализа функционального континуума регуляторных пептидов. *Биоорганическая химия* 2006; 32 (3): 249–257.
3. Пинелис В.Г., Быкова Л.П., Богачев А.П., Исаев Н.К., Викторов И.В., Ходоров Б.И. Глутамат вызывает снижение внутриклеточного содержания АТФ. *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 1997; 123 (2): 162-164.
4. Скоромец А.А., Стаховская Л.В., Белкин А.А., Шеховцова К.В., Кербилов О.Б., Буренчев Д.В., Гаврилова О.В., Скворцова В.И. Новые возможности нейропротекции в лечении ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова* 2008; 22: 32-38.

5. Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Сенилова Я.Е. с соавт. Изменение содержания АТФ в зернистых клетках мозжечка при гиперстимуляции глутаматных рецепторов: возможное участие NO и нитритных ионов. Бюлл. эксперим. биол. 2007; 4: 419–422.
6. Хама-Мурад А.Х., Павлинова Л.И., Мокрушин А.А. Геморрагический инсульт: молекулярные механизмы патогенеза и перспективные терапевтические мишени. Успехи физиол. наук 2008; 39 (3): 45-65.
7. Ходоров Б.И. Митохондриальная деполяризация играет доминирующую роль в механизме нарушения нейронального кальциевого гомеостаза, вызванного глутаматом. Биол. мембраны 2001; 18 (6): 421–432.
8. Dambinova S.A., Granstrem O.K., Tourov A., Salluzzo R., Castello F., Izykenova G.A. Monitoring of brain spiking activity and autoantibodies to N-terminus domain of GluR1 subunit of AMPA receptors in blood serum of rats with cobalt-induced epilepsy. J. of Neurochem. 1998; 5: 2088-2093.
9. Dambinova S.A., Khounteev G.A., Izykenova G.A., Zavolokov I.G., Ilyukhina A.Y., Skoromets A.A. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. Clin.Chem. 2003; 49 (10): 1752-1762.
10. De Wied D. Neuropeptides in learning and memory processes. Behav. Brain. Res. 1997; 83: 83–90.
11. Hossmann KA. Experimental models for the investigation of brain ischemia. Cardiovascular Research 1998; 39 (1): 106-20.
12. Krieger C. Mitochondria, Ca²⁺ and neurodegenerative disease. Europ. J. Pharmacol. 2002; 447: 177–188.
13. O'Collins V.E., Macleod M.R., Donnan G.A. et al. 1,026 Experimental Treatments in Acute Stroke. Ann. of Neurol. 2006; 59: 467–477.
14. Pinelis V.G., Storozhevych T.P., Surin A.M. et al. Neuroprotective effects of cortagen, cortexin and semax on glutamate neurotoxicity. J. Peptide Science 2008; 14 (8): 159–160.

Поступила в ___ г.