



Положительное влияние церебролизина на восстановление мозга после ишемии

В структуре неврологической патологии одними из наиболее опасных заболеваний были и остаются цереброваскулярные, осложнения которых ежегодно уносят миллионы жизней. Более того, в последние годы отмечается тенденция к повышению частоты развития инсультов у лиц молодого возраста. Поэтому поиск новых терапевтических решений по-прежнему очень актуален. В результате многих испытаний было установлено, что воздействие на накопление β -амилоида ($A\beta$), аутофагию или апоптоз может служить в качестве новой терапевтической стратегии. S. Xing et al. провели исследование, целью которого было определить способность церебролизина предотвращать накопление $A\beta$ и вторичное повреждение таламуса при очаговом церебральном инфаркте, а также изучить возможные механизмы, лежащие в основе нейропротекторного действия церебролизина. Результаты представлены в статье «Cerebrolysin reduces amyloid- β deposits, apoptosis and autophagy in the thalamus and improves functional recovery after cortical infarction», которая была опубликована в *Journal of the Neurological Sciences* (2013).

Очаговый церебральный инфаркт вызывает потерю нейронов и пролиферацию клеток нейроглии в ипсилатеральных отделах таламуса (Tamura, 1991; Block, 2005). Подобное вторичное повреждение таламуса может привести к задержке восстановления нейронов или даже устойчивой деменции (Tamura, 1991; Freret, Chazalviel, 2006). Таким образом, профилактика вторичных нейродегенеративных процессов имеет важное клиническое значение при ишемическом инсульте. В ходе многих испытаний была выявлена патологическая агрегация $A\beta$ после перенесенного церебрального инфаркта, локализирующаяся преимущественно в ипсилатеральных отделах таламуса. Кроме того, исследователи обнаружили, что уменьшение накопления $A\beta$ предотвращает вторичную гибель нейронов в таламусе (van Groen, 2005; Makinen, 2008; Hiltunen, 2009; Zhang, 2011). В экспериментальной модели ишемического инсульта механизмы апоптоза играли не последнюю роль в отсроченном повреждении нейронов таламуса (Soriano, 1996; De Bilbao, 2000). Кроме того, в недавно проведенных исследованиях показано,

что блокада активации аутофагальной гибели уменьшает вторичную потерю нейронов и глиоз в ипсилатеральных отделах таламуса, возникающие при церебральном инфаркте (Xing, 2012). В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что изменение накопления $A\beta$, аутофагии или апоптоза может выступать в качестве новой терапевтической стратегии.

Церебролизин представляет собой смесь низкомолекулярных нейропептидов и свободных аминокислот. Препарат имеет клинический терапевтический потенциал при нейродегенеративных заболеваниях и инсульте (Chen, 2004; Alvarez, 2011; Heiss, 2012). Доклинические исследования в экспериментальных моделях инсульта продемонстрировали, что церебролизин способствует функциональному неврологическому восстановлению независимо от объема инфаркта (Schwab, 1998; Ren, 2007). Нейропротекторные эффекты данного препарата включают различные механизмы, в том числе инактивацию свободных радикалов, предотвращение эксайтотоксичности, модуляцию активности кальпаина и клеточного апоптоза (Gonzalez, 1998; Wronski, 2000; Schauer,

2006). Кроме того, в ходе исследований было показано, что церебролизин существенно улучшает неврологическое восстановление и способствует вызванному поражением эндогенному нейрогенезу путем модуляции внутриклеточного сигнального пути, связанного с фосфоинозитол-3-киназой/протеинкиназой В (PI3K/Akt) или hedgehog-опосредованного внутриклеточного сигнального каскада (Zhang, Chopp, 2010; Zhang, 2013). Тем не менее, возможное влияние церебролизина на вторичное повреждение нейронов при ишемическом инсульте требует дальнейшего изучения.

Материалы и методы исследования

Исследование включало группу склонных к инсульту крыс с реноваскулярной артериальной гипертензией, состоящую из 50 самцов породы Sprague Dawley, которые были взяты в Ресурсном центре медицинских лабораторных животных Гуандуна (Китай). Артериальное давление в покое измерялось один раз в неделю непрямой способом с использованием сфигмоманометра с хвостовой манжетой (ML866 Powerlab 4/30, AD Instruments Pty Ltd, Сидней, Австралия). Спустя 12 недель у 42 крыс с систолическим артериальным давлением 180 мм рт. ст. без симптомов инсульта был смоделирован церебральный инфаркт и проведено ложное хирургическое вмешательство.

Индукцию очагового церебрального кортикального инфаркта проводили путем дистальной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) (Bederson, 1986). Так, под анестезией 10% хлоралгидратом (3 мл/кг массы тела) была выполнена ОСМА крыс дистальнее отхождения стриарных ветвей с помощью биполярной электрокоагуляции, что привело к появлению постоянных очагов инфаркта в неокортексе. Во время хирургического вмешательства и в восстановительный период с помощью грелки поддерживалась температура тела на уровне $37 \pm 0,5$ °С. Экспериментальные крысы с успешно проведенной ОСМА были рандомизированы на группы церебролизина и плацебо (физиологический раствор) по 12 особей в каждой. Животные в группе ложной операции подвергались аналогичным манипуляциям, за исключением окклюзии СМА (12 крыс). Еще шесть крыс были исключены из исследования по причине неудачной ОСМА.

Лечение церебролизинном

Спустя 24 часа после дистальной ОСМА крысам в группе церебролизина вводили раствор препарата (5 мл/кг) один раз в день в течение 13 дней путем внутрибрюшинных инъекций. Крысы в группе плацебо получали такую же дозу 0,9% NaCl в качестве контроля, а животным, подвергшимся ложному хирургическому вмешательству, не проводили никаких инъекций.

Тест на удаление липкой ленты

С целью оценки соматосенсорного дефицита на 14-й день после ОСМА у экспериментальных крыс вслепую проводился тест на удаление липкой ленты (Schallert, 1983). После адаптации в тестовой среде два небольших отрезка липкой ленты (равного размера, 113,1 мм²)

приклеивались крысам к дистально-радиальной области запястий каждой передней конечности. Удаление раздражителя с передней конечности проводили не ранее чем через 5 минут. Испытание повторяли до пяти раз в день для каждой конечности, фиксируя при этом исчезновение последствий местной ишемии.

Гистологические препараты

Спустя 14 дней после ОСМА под глубоким наркозом 10% хлоралгидратом интраперитонеально (4 мл/кг массы тела) 8 крысам, случайным образом выбранным из каждой группы, путем внутрисердечной инъекции вводили 0,9% раствор NaCl (температура – 4 °С, а затем 4% параформальдегид в фосфатном буфере (ФБ, 0,1 М, pH 7,4). Головной мозг животных удаляли, помещали в тот же фиксатор на 6 часов при температуре 4 °С и далее последовательно помещали в 20 и 30% раствор сахарозы до полного погружения. Корональные срезы (толщиной 10 мкм) были выполнены при помощи криостата (CM1900, Leica, Хайдельберг, Германия) и хранились при температуре -80 °С.

Окрашивание по методу Ниссля

Серия корональных срезов каждой группы между +4,7 и -5,2 мм от брегмы была отобрана для окрашивания по методу Ниссля с целью определения объема первичного кортикального инфаркта и гистологического повреждения в таламусе. Рутинное окрашивание срезов мозговой ткани по Ниссля проводилось 0,3% крезилловым фиолетовым (860980, Sigma).

Иммунофлуоресцентные маркеры

Другую серию корональных срезов между -2,8 и -4,4 мм от брегмы отбирали для проведения иммунофлуоресцентного окрашивания по стандартной методике. Срезы промывали в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) и блокировали 5% нормальной козьей сывороткой в течение одного часа при комнатной температуре. После этого срезы в течение ночи при температуре 4 °С инкубировали с первичными антителами. Инкубацию срезов для отрицательного контроля проводили с 0,01 М фосфатным буферизированным солевым раствором. После этого срезы промывали 0,01 М фосфатно-солевым буфером, затем инкубировали при комнатной температуре в течение часа с вторичными антителами: FITC-конъюгированными козьими антителами против мышинового IgG или Cy3-конъюгированными козьими антителами против кроличьего IgG (1 : 100 и 1 : 200 соответственно, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Для серии криосрезов применяли терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансфераза-опосредованную маркировку концов ДНК дУТФ, меченным биотином (методика TUNEL) и окрашивание с использованием комплекта для обнаружения гибели клеток *in situ*, содержащего тетраметилродамин красный (Roche Diagnostics).

Иммуноблоттинг

Еще по 4 крысы из каждой группы умерщвляли спустя 14 дней с внутрисердечным введением 0,9%

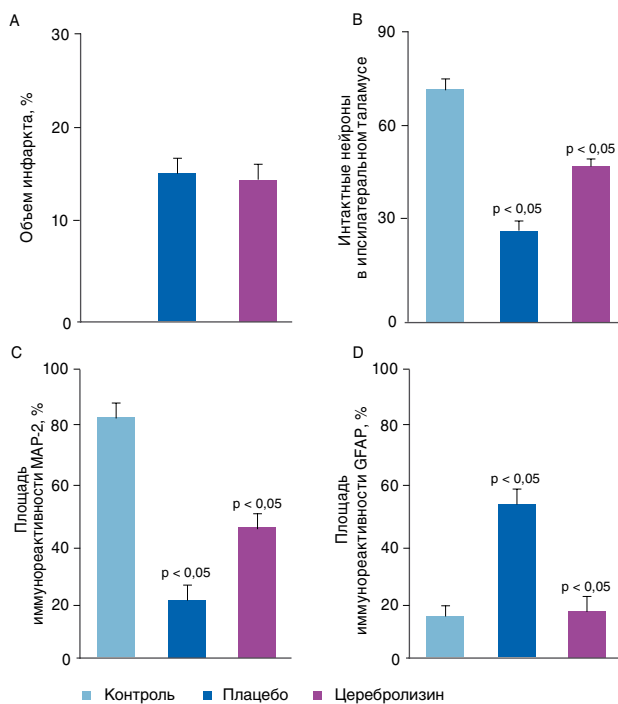


Рис. 1. Церебролизин уменьшает вторичное повреждение в ипсилатеральном таламусе после кортикального церебрального инфаркта

раствора NaCl и отделяли контралатеральный либо ипсилатеральный отделы таламуса. Общий белок был экстрагирован путем применения содержащего ингибитор протеаз лизисного буфера для иммуноблоттинга (Pierce). Затем гомогенат центрифугировали при 14000 об./мин в течение 15 минут при 4 °С, а супернатант хранили при температуре –80 °С. Далее 80 мкг каждого образца отделяли путем электрофореза в 10% геле SDS-PAGE и переносили на мембрану из поливинилиденфторида (Millipore). Эти мембраны блокировали 5% обезжиренным молоком (BCR685, Sigma) и проводили инкубацию с первичными и вторичными антителами. Мембраны обрабатывали хемилюминесцентным веществом (Cell Signaling Technology) и далее экспонировали на светочувствительной пленке Kodak X-OMAT.

Количественный и качественный анализ изображений

Каждый 12-й окрашенный по методу Ниссля срез, выполненный между +4,7 и –5,2 мм от брегмы, был выбран для оценки. Объем первичного кортикального инфаркта выражался в процентах от объема контралатерального полушария (Xing, 2012). Каждый 6-й срез между –2,8 и –4,4 мм от брегмы был выбран научным сотрудником вслепую согласно протоколу исследования для количественного анализа окрашенных по Нисслию или подвергшихся иммуноокрашиванию срезов таламуса. Интактные нейроны, иммуноокрашенные и TUNEL-положительные клетки были посчитаны в пределах трех не пересекающихся полей (425 x 320 мкм² под 400-кратным увеличением) в таламусе каждого среза. Для количественного определения накопления Аβ в таламусе определялась площадь Аβ-флуоресценции. Для иммуноблоттинга относительную плотность полос вычисляли с помощью программы

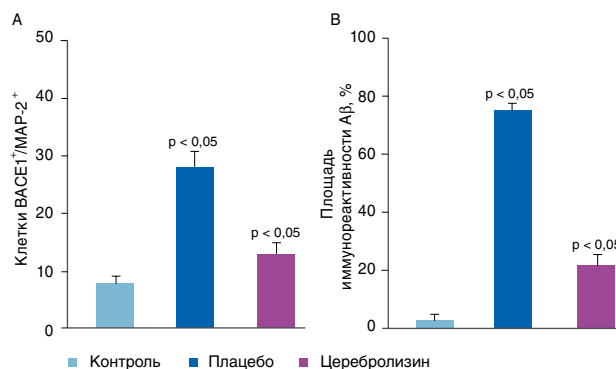


Рис. 2. Церебролизин снижает уровень BACE1 и накопление Аβ в ипсилатеральном таламусе после кортикального церебрального инфаркта

анализа изображений. Кроме того, были рассчитаны соотношения расщепленной каспазы-3 к каспазе-3 и Bcl-2, Bcl-XL, Вах по отношению к β-актину или LC3-II по отношению к LC3-I соответственно.

Статистический анализ

Данные представлены в виде среднего значения (M) ± стандартное отклонение (СО). Статистический анализ был проведен с использованием методики однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Краскела – Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при p < 0,05.

Результаты исследования

Спустя 14 дней после дистальной ОСМА среднее время исчезновения следов липкой ленты с левой конечности в группе крыс, подвергшихся ложной операции, составило 5,0 ± 1,5 секунд. Среднее время исчезновения следов от липкой ленты с левой конечности в группе плацебо было 11,5 ± 3,0, что значительно превышает этот показатель в группе ложного хирургического вмешательства (p < 0,05). Лечение церебролизином в сравнении с плацебо существенно уменьшало время удаления следов липкой ленты с левой конечности (6,0 ± 4,0, p < 0,05).

Объемы инфаркта существенно не отличались в группах церебролизина и плацебо (рис. 1А, p > 0,05). Однако у животных при применении плацебо спустя 14 дней после ОСМА в ипсилатеральных отделах таламуса были обнаружены атрофические нейроны с разрушенными ядрами и усохшей цитоплазмой. Количество интактных нейронов в ипсилатеральном таламусе было существенно больше в группе церебролизина, чем плацебо (рис. 1В, p < 0,05). Как и следовало ожидать, MAP-2⁺ нейронов в ипсилатеральных отделах таламуса крыс в группе плацебо было значительно меньше по сравнению с группой животных, подвергшихся ложной операции (p < 0,05). Лечение церебролизином заметно увеличивало количество MAP-2⁺ нейронов в сравнении с плацебо (рис. 1С, p < 0,05). И наоборот, число GFAP⁺ нейронов в ипсилатеральном таламусе крыс при применении церебролизина значительно уменьшалось в сравнении с группой плацебо (рис. 1D, p < 0,05).

Соотношение клеток BACE1⁺/MAP-2⁺ в ипсилатеральном таламусе было существенно больше спустя

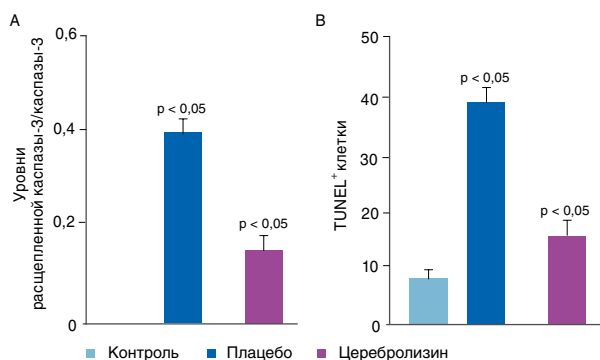


Рис. 3. Церебролизин уменьшает расщепление каспазы-3 и апоптоз в ипсилатеральном таламусе после кортикального церебрального инфаркта

14 дней после ОСМА в сравнении с группой животных, подвергшихся ложной операции ($p < 0,05$). При использовании церебролизина значительно уменьшалось количество MAP-2⁺ в ипсилатеральных отделах таламуса крыс в группе плацебо на том же отрезке времени (рис. 2А, $p < 0,05$). Как результат, в группе плацебо на 14-й день после ОСМА наблюдалась масштабная Аβ-иммунореактивность. В дополнение к вышесказанному, лечение церебролизинном заметно уменьшало выявление окрашенного Аβ в ипсилатеральных отделах таламуса в сравнении с группой плацебо (рис. 2В, $p < 0,05$).

В ипсилатеральном таламусе крыс на 14-й день после ОСМА был повышен уровень расщепленной каспазы-3, чего не наблюдалось у животных, подвергшихся ложному хирургическому вмешательству. Соотношение расщепленной каспазы-3 к общему ее количеству было существенно выше в ипсилатеральных отделах таламуса в группе плацебо в сравнении с животными, подвергшимися ложной операции ($p < 0,05$). Церебролизин заметно уменьшал соотношение расщепленной каспазы-3 к общему ее количеству в ипсилатеральных отделах таламуса в сравнении с группой плацебо ($p < 0,05$). Расщепленная каспаза-3 в большей мере окрашивалась MAP-2, чем GFAP при двойном окрашивании. Как и следовало ожидать, в ипсилатеральных отделах таламуса крыс в группе плацебо на 14-й день после ОСМА регистрировалось значительное количество TUNEL⁺ клеток. Данных клеток было существенно меньше в ипсилатеральном таламусе животных при применении церебролизина по сравнению с группой плацебо (рис. 3, $p < 0,05$).

Спустя 14 дней после ОСМА в ипсилатеральных отделах таламуса крыс наблюдалось повышенное превращение LC3-II, чего не было в группе животных, подвергшихся ложной операции. Соотношение LC3-II/LC3-I в ипсилатеральных отделах таламуса крыс, у которых использовали плацебо, было существенно выше, чем у подвергшихся ложному хирургическому вмешательству. Лечение церебролизинном существенно уменьшало соотношение LC3-II/LC3-I в ипсилатеральном таламусе по сравнению с группой плацебо (рис. 4А, $p < 0,05$). Двойное окрашивание показало, что LC3-позитивные клетки в основном окрашивались MAP-2, чем GFAP.

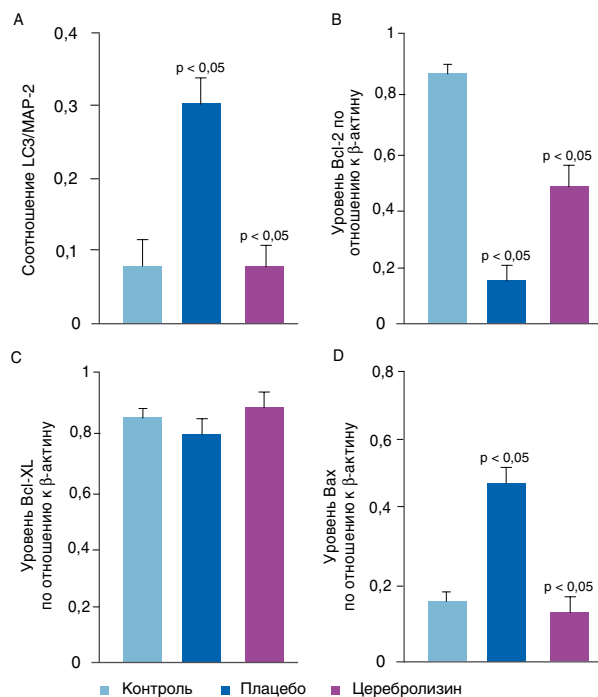


Рис. 4. Церебролизин уменьшает активацию аутофагии (А), повышает уровень Vcl-2 и снижает уровень Vax (B-D) в ипсилатеральном таламусе после кортикального церебрального инфаркта

Уровни Vcl-2 в ипсилатеральных отделах таламуса крыс в группе плацебо были существенно ниже, чем у подвергшихся ложной операции ($p < 0,05$). Церебролизин заметно увеличивал уровни Vcl-2 в ипсилатеральном таламусе в сравнении с группой плацебо (рис. 4В, $p < 0,05$). Уровни Vcl-XL значительно не отличались на 14-й день во всех трех группах (рис. 4С, $p > 0,05$). И напротив, уровни Vax были выше у крыс в группе плацебо по сравнению с теми, кому выполняли ложное хирургическое вмешательство ($p < 0,05$). Лечение церебролизинном заметно снижало уровни Vax в ипсилатеральном таламусе в сравнении с группой плацебо (рис. 4D, $p < 0,05$).

Обсуждение

В ходе данного исследования было установлено, что при очаговом церебральном инфаркте происходит патологическое накопление Аβ в сочетании с повышением уровней расщепленной каспазы-3 и LC3-II в ипсилатеральных отделах таламуса. Длительное применение церебролизина снижало накопление Аβ, а также явления апоптоза и аутофагии в ипсилатеральных отделах таламуса, что сопровождалось уменьшением вторичного повреждения нейронов и соматосенсорного функционального дефицита, возникающих вследствие церебрального инфаркта. Кроме того, результаты свидетельствуют о том, что церебролизин уменьшает накопление Аβ, подавляет апоптоз и аутофагию и снижает вторичное повреждение таламуса, равно как и функциональный дефицит, возникающие после очагового церебрального инфаркта.

Известно, что накопление Аβ занимает определенное место в развитии вторичной нейродегенерации в экспериментальных моделях с транзиторной или постоянной ОСМА (van Groen, 2005; Makinen,

2008; Hiltunen, 2009; Zhang, 2011). При проведении данного исследования было выявлено, что патологическое накопление Аβ связано с потерей нейронов и активацией астроглии в ипсилатеральных отделах таламуса после очагового церебрального инфаркта. Длительное лечение церебролизином существенно уменьшало накопление Аβ и предотвращало вторичное повреждение нейронов в ипсилатеральном таламусе после церебрального инфаркта, что дает возможность предположить наличие у препарата протекторного эффекта в отношении связанной с Аβ нейродегенерации. Помимо прочего, было показано, что церебролизин уменьшал проявления деменции при болезни Альцгеймера (БА) путем угнетения созревания белка предшественника амилоида в трансгенной модели БА у мышей (Rockenstein, 2006).

ВАСЕ1 играет ключевую роль в образовании Аβ, и угнетение активности ВАСЕ1 сокращает накопление Аβ в БА-моделях (Zhao, 2007; Fukumoto, 2010). В данном испытании показано, что уровни белка ВАСЕ1 в нейронах были значительно повышены, однако снижались под влиянием церебролизина, что доказывает его способность уменьшать образование Аβ путем снижения количества ВАСЕ1 в ипсилатеральном таламусе после церебрального инфаркта. Однако церебролизин также может угнетать активацию циклинзависимой киназы-5 и киназы-3β-гликогенсинтазы (Rockenstein, 2006), участвующих в активации γ-секретазного комплекса (Ryder, 2003; Wen, 2008). Для того чтобы определить, может ли церебролизин угнетать активность γ-секретазы и таким образом тормозить образование Аβ в ипсилатеральных отделах таламуса после церебрального инфаркта, необходимы дальнейшие исследования.

Кроме того, в ходе испытания была зафиксирована связь активации каспазы, индукции Вах и угнетения Bcl-2 с Аβ-индуцированной смертью нейронов (Трой, 2000; Selznick, 2000; Awasthi, 2005). Показано, что накопление Аβ сопровождалось активацией каспазы-3, угнетением Bcl-2 и повышением активности Вах в ипсилатеральных отделах таламуса после церебрального инфаркта. В дополнение к этому, лечение церебролизином предотвращало накопление Аβ, активацию каспазы-3, угнетение Bcl-2 и повышение активности Вах в ипсилатеральных отделах таламуса, что дает возможность предположить потенциальный эффект церебролизина при Аβ-индуцированном апоптозе. Кроме того, Аβ также является медиатором аутофагальной активации в нейронах, а угнетение процесса аутофагии может предотвратить повреждение нейронов таламуса после церебрального инфаркта (Xing, 2012; Ling, 2009).

Результаты данного исследования продемонстрировали, что лечение церебролизином существенно уменьшало превращение LC3-II в нейронах ипсилатеральных отделов таламуса, а также проявления вторичного его повреждения, сопровождающего очаговый церебральный инфаркт. Это доказывает, что церебролизин снижает повреждение в таламусе, угнетая процесс аутофагии. Аутофагия и апоптоз могут иметь общие пусковые механизмы, и семейство антиапоптотических протеинов Bcl-2 иногда участвует в регуляции процесса аутофагии (Pattingre, 2005). Полученные данные свидетельствуют о том, что церебролизин существенно уменьшал ингибирование Bcl-2 в ипсилатеральных отделах таламуса, что снижало проявление как аутофагии, так и апоптоза. Однако церебролизин может угнетать апоптоз в ипсилатеральных отделах таламуса путем торможения аутофагии, поскольку угнетение таковой блокирует апоптоз-опосредованную клеточную смерть (Koike, 2008).

Ранее проведенные испытания показали, что церебролизин улучшает неврологическое функциональное восстановление без уменьшения объема инфаркта (Rep, 2007). Полученные данные подтвердили, что продолжительное лечение церебролизином сокращает нейродегенеративные нарушения в ипсилатеральном таламусе и ускоряет восстановление соматосенсорных функций без уменьшения объема инфаркта коры. Поскольку повреждение таламуса играет важную роль в возникновении сенсорного дефицита после ОСМА, функциональное восстановление может быть частично связано с предотвращением поражения нейронов таламуса под влиянием церебролизина (Freret, 2006). С другой стороны, эффект церебролизина может также быть обусловлен его нейротрофическим действием, а уменьшение сенсорного дефицита – улучшением синаптической формации и регенерации холинергических волокон или защитой от эксайтотоксичности (Windholz, 2000; Satou, 2000; Veinbergs, 2000).

Выводы

Таким образом, результаты данного исследования предоставили новые доказательства того, что церебролизин может быть эффективен в лечении отсроченного повреждения таламуса, вторичного по отношению к церебральному инфаркту.

Подготовила Лариса Калашник

ⓘ