

Запорожский государственный медицинский университет

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ
НЕЙРОПРОТЕКЦИИ**

профессор И.Ф. Беленичев

ЧМТ

НЕЙРОИНФЕКЦИЯ

МОЗГОВЫЕ
ИНСУЛЬТЫ

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ
ПАТОЛОГИИ

ПОСТГИПОКСИЧЕСКАЯ
ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ

ХРОНИЧЕСКИЙ
АЛКОГОЛИЗМ

**НЕЙРОА
ПОПТОЗ**

КОГНИТИВНЫЙ ДЕФИЦИТ



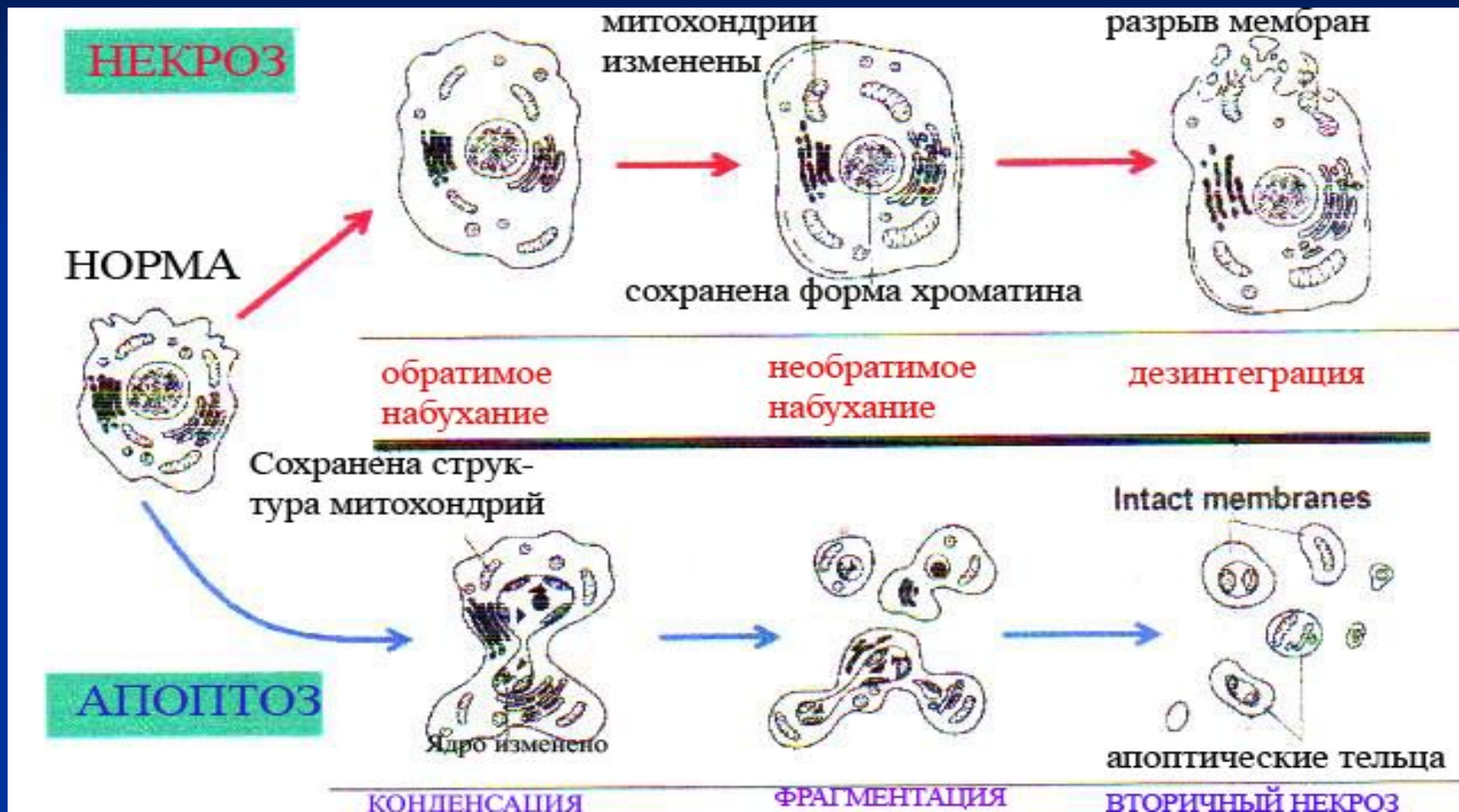
Стадии апоптоза

- 1. Инициации (индукции)
- 2. Эффекторная
- 3. Деградации

Факторы иницирующие нейроапоптоз - цитокины, гормоны, АФК, дериваты NO, окисленные тиолы, продукты окислительной модификации белков и нуклеиновых кислот . Первичная реакция стадинга нейроапоптоза реализуется генами раннего реагирования

– c-fos

Стадии нейроапоптоза



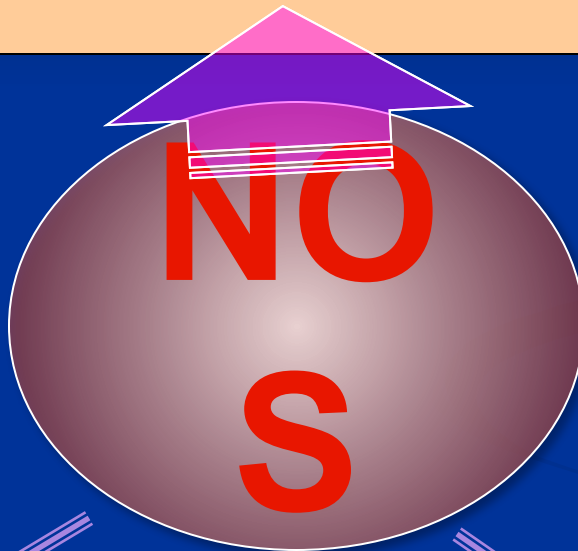
NO синтезируется из
L-аргинина при участии
кислорода, НАДФ,
ионов Ca^{2+} под действием
нитрооксидсинтаз (**NOS**)

eNOS
(эндотелиальная
NOS)

nNOS
(нейрональная
NOS)

iNOS
(индуцибельная
NOS)

mNOS
(митохондриальная
NOS)



Проапоптотические дериваты NO

- NO в клетках мишенях образует активные дериваты, такие как нитрозоний (NO⁺), нитроксил (NO⁻) и пероксинитрит (ONOO). Исследованиями последних лет установлено, что NO, и особенно продукты его превращения, такие как пероксинитрит (ONOO⁻), ион нитрозония (NO⁺), нитроксил (NO⁻) и диазоттриоксид (N₂O₃), являются основными факторами реализации нитрозирующего стресса – реакции взаимодействия NO⁺ (S, N, O нитрозирование) с тиольными, фенольными, гидроксильными и аминогруппами белков и ДНК и инициации нейроаптоза

Прод
укция
O₂

Наличие



L-Arg



Биологическ
ие

повреждения

АПОПТОЗ

повышение
концентрации
 Ca^{2+} в матриксе

выход
цитохрома C
из
митохондрий

усиление
перекисного
окисления
липидов

Ингибирование
NOS
(L-NMMA),
поглотителем
пероксинитрита
и экспрессией
Bcl-2

Нейродегенеративные
расстройства

Локальное
термическое
повреждение
мозга



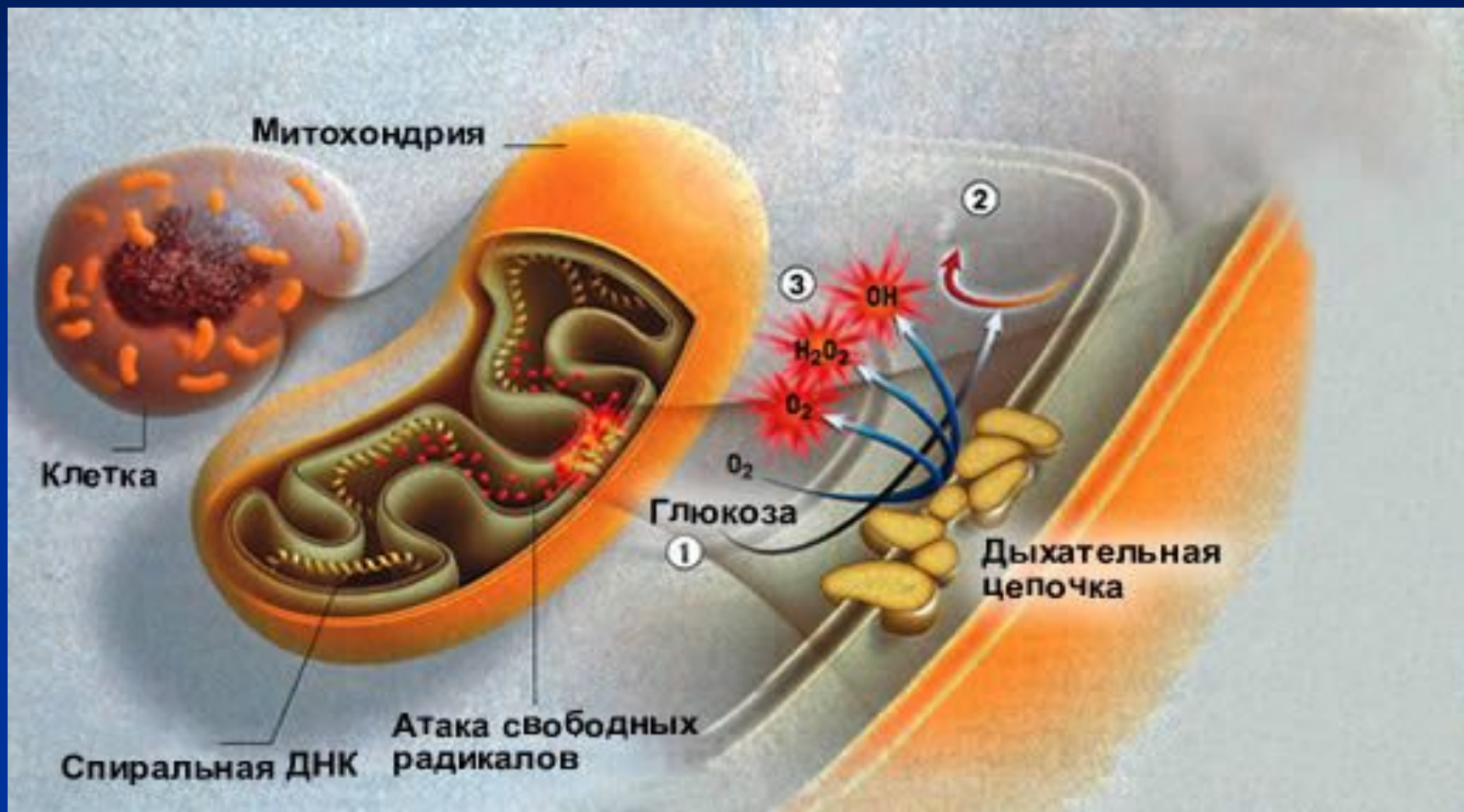
Транзиторная
церебральная
ишемия

Эпилептогенные
судороги

Интрацеребральная
геморрагия

- Митохондриальная дисфункция - типовой патологический процесс не имеющий этиологической специфичности, характеризующийся нарушением продукции и транспорта энергии, образованием АФК в «паразитарных» энергетических реакциях, повреждением мембран митохондрий и ДНК, открытием митохондриальных пор, экспрессией проапоптотических белков.

Продукция АФК при митохондриальной дисфункции



- Митохондриальная дисфункция - новый патобиохимический механизм церебральной патологии широкого спектра. Выделяют два вида митохондриальной дисфункции – первичную, как следствие врожденного генетического дефекта и вторичную, возникающую под действием различных факторов: гипоксия, ишемия, оксидативный и нитрозирующий стресс, экспрессия провоспалительных цитокинов

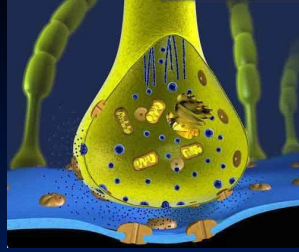
Проявления первичной МД

- MELAS – митохондриальная миопатия, энцефалопатия, лактатный ацидоз, инсультоподобные эпизоды.
- CPEO/PEO – офтальмоплегия, связанная с поражением глазодвигательных мышц, офтальмоплегия плюс синдром.
- KSS – ретинопатия, слабость проксимальных мышц, аритмия, атаксия.
- MERRF – миоклоническая эпилепсия с обнаружением RRF.
- LHON – врожденная нейропатия глазного нерва.
- Leig syndrome – инфантильная подострая некротизирующая энцефалопатия.
- NARP – нейропатия, атаксия и пигментная ретинопатия.

Вторичные МД в качестве звеньев патогенеза

- интрацеребральная геморрагия, хроническое нарушение мозгового кровообращения, эпилептогенные судороги, локальное термическое повреждение мозга, нейродегенеративные расстройства, транзиторная церебральная ишемия, синдром хронического утомления, мигрени, кардиомиопатии, алкогольные энцефалопатии, сенильная деменция, нейроинфекции, кардиомиопатии, гликогенозы, болезни соединительной ткани, диабет, рахит, тубулопатии, панцитопения, гипопаратиреоз, печеночная недостаточность и др.

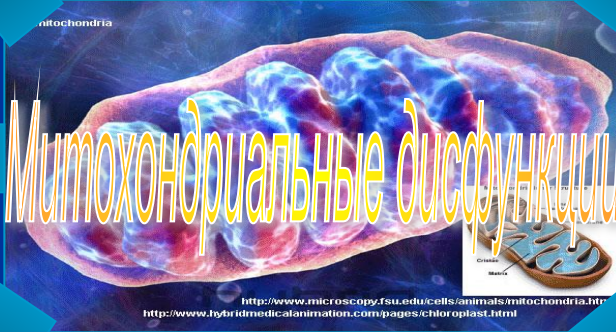
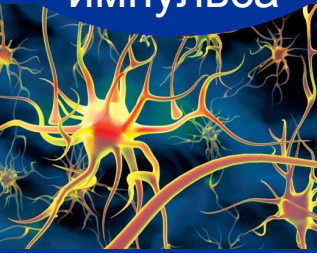
- Открытие пор происходит за счет окисления тиольных групп цистеин-зависимого участка белка внутренней мембраны митохондрий (АТФ/АДФ - антипортер), что превращает его в проницаемый неспецифический канал-пору. Открытие пор превращает митохондрии из «электростанций» в «топку» субстратов окисления без образования АТФ, сопровождается снижением мембранного потенциала, высокоамплитудным набуханием митохондрий, разрывом внешней мембраны и выходом проапоптотических факторов.



«Паразитарны
е»
энергетически
е
реакции

Нарушение
обратного
захвата
медиаторов
(КХА, Ср, ДА,
ГЛ)

Нарушение
ионного
транспорта,
генерации и
проведения
импульса



Нарушение
процессов
трансляции
и
транскрипции

Нарушение
синтеза
белка
de novo

Апоптоз
(некроз)

АТФ

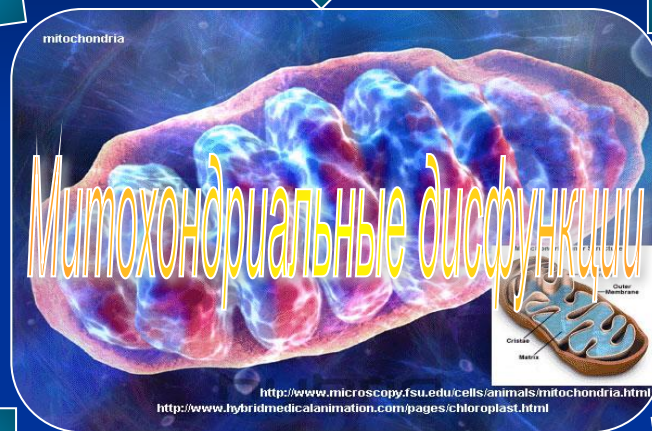


АТФ

Глутаматная
эксайтотоксичность

Митохондриальная
модификация
м-ДНК

Дефицит O_2



Избыток
 Ca^{++}

Окислительный
стресс

Гиперпродукция
 NO и
нитрозирующий
стресс

C-FOS



«НОРМОЭКСПРЕССИЯ»

«ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ»



АКТИВАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ,
ТРАНСКРИПЦИИ

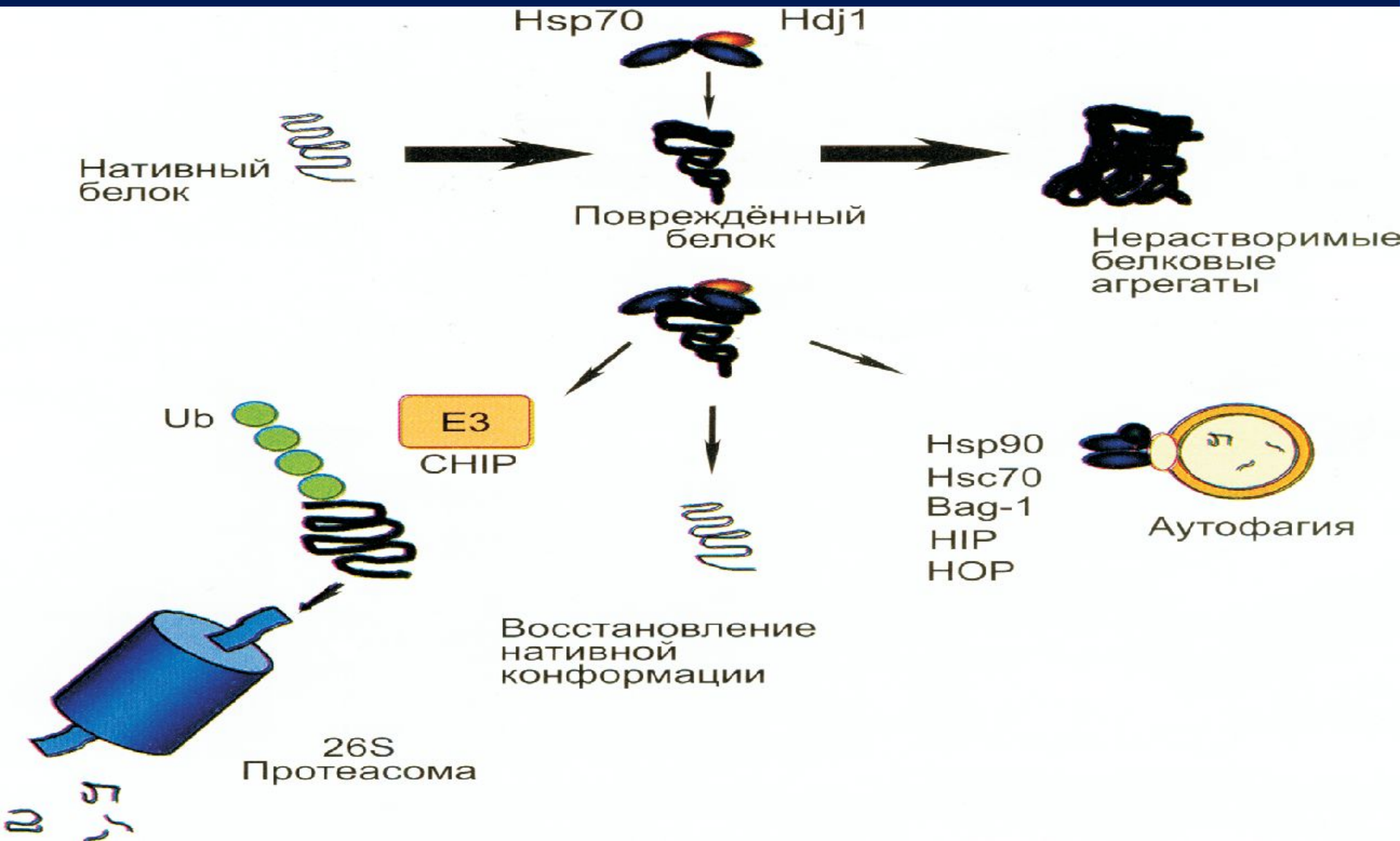
ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК,
АКТИВАЦИЯ NO-СИНТАЗЫ,
НАКОПЛЕНИЕ
ПЕРОКСИНИТРИТА



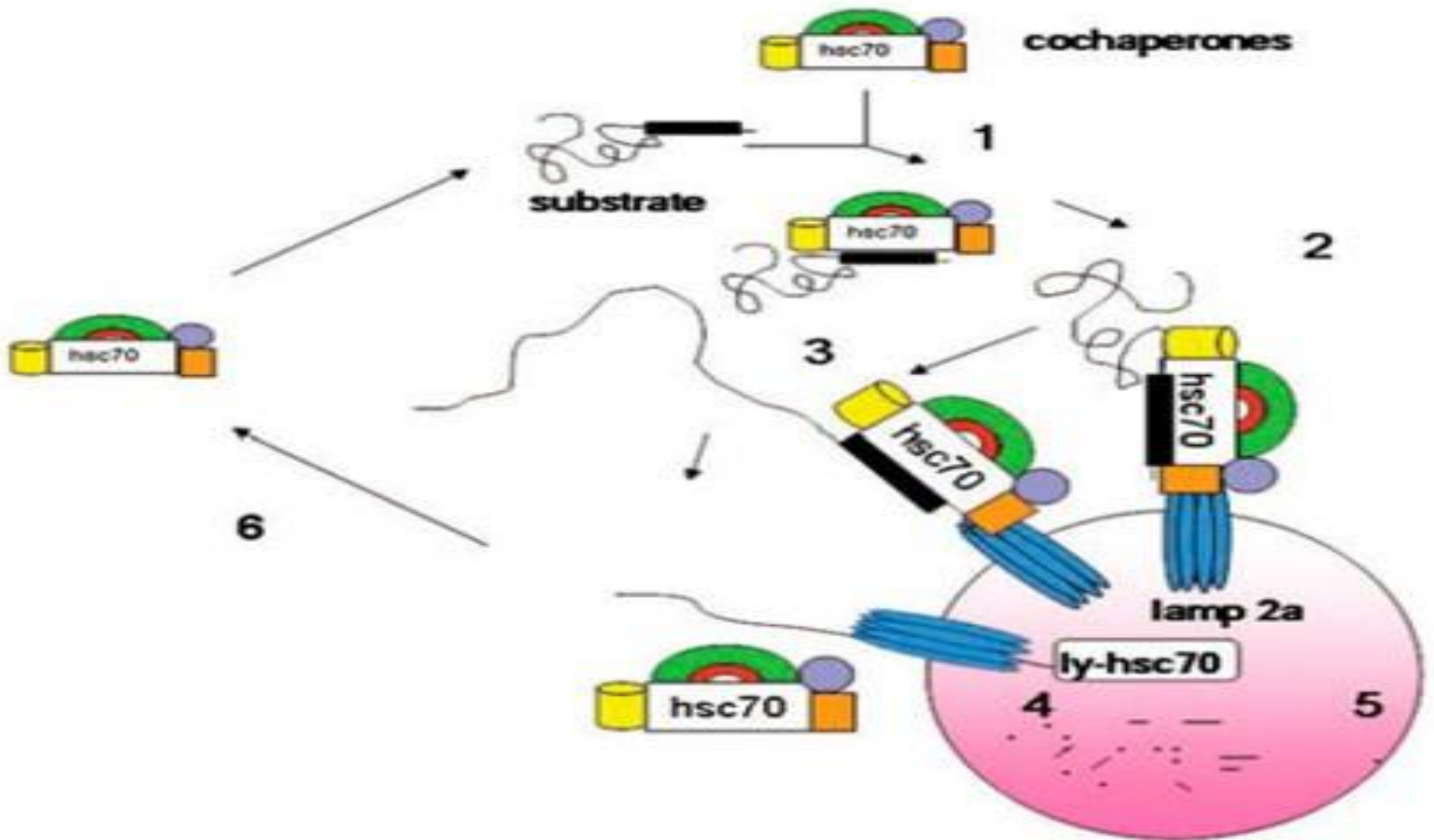
СИНТЕЗ ПЛАСТИЧЕСКИХ
КОМПОНЕНТОВ КЛЕТКИ

АПОП
ТОЗ

Схема работы HSP 70 в митохондриях



Шаперонная функция HSP70



Известные антиапоптотические механизмы Hsp70

- Hsp70 блокирует пусковой рецептор апоптоза Fas/Apo-1
- Hsp70 ингибирует апоптоз в митохондриии на этапе между высвобождением цитохрома с и расщеплением прокаспазы-9
- Hsp70 препятствует связи цитохрома С с проапоптотическим белком Аraf-1 в митохондриии

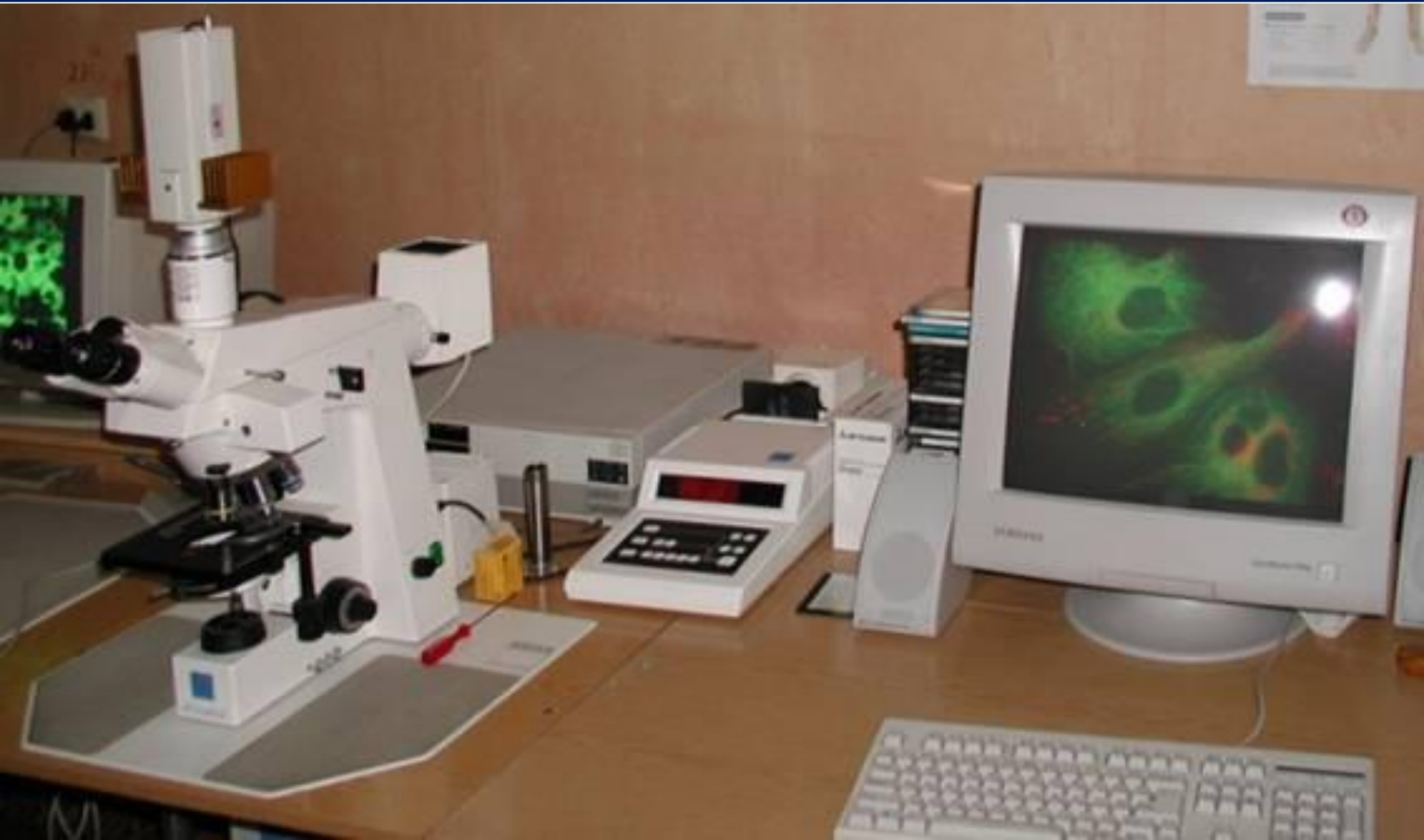


**Неврологический дефицит
средней степени тяжести
(животные с ОНМК
получавшие
нейропротективную
терапию)**

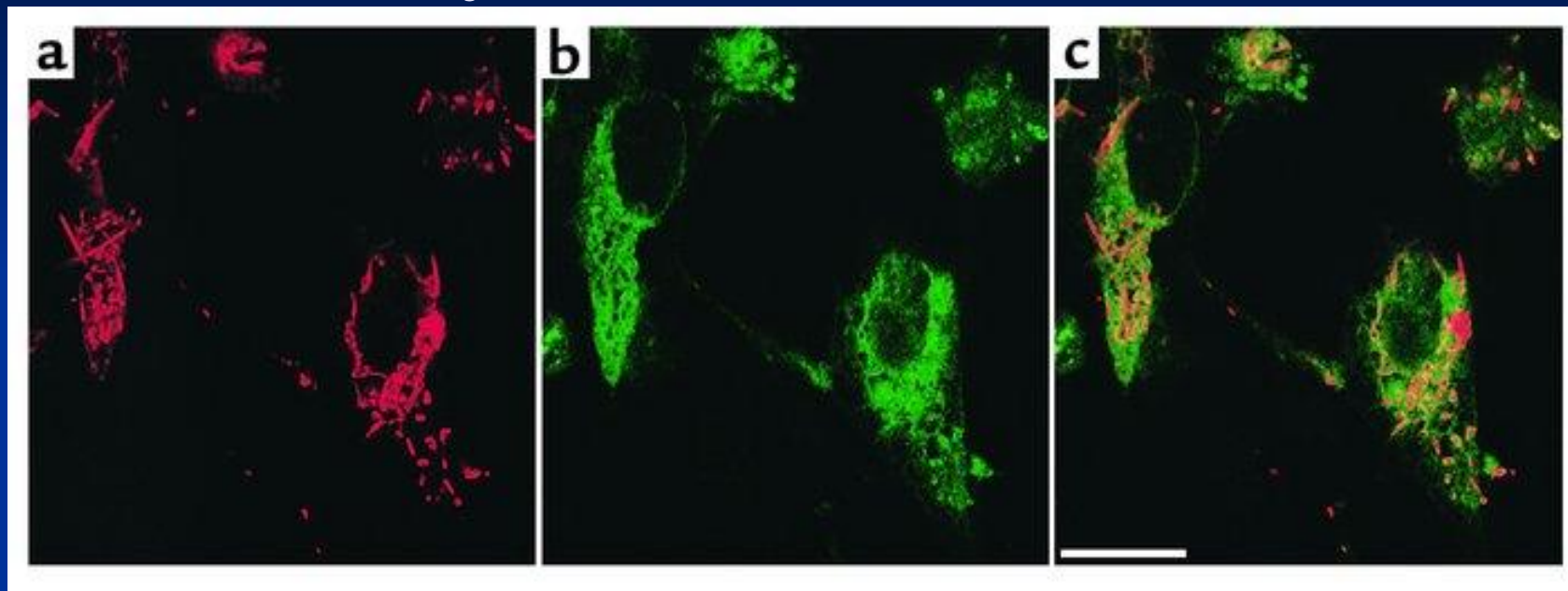


**Тяжелый
неврологический
дефицит (4 сутки
моделирования
ОНМК)**

Метод гистоиммунохимии

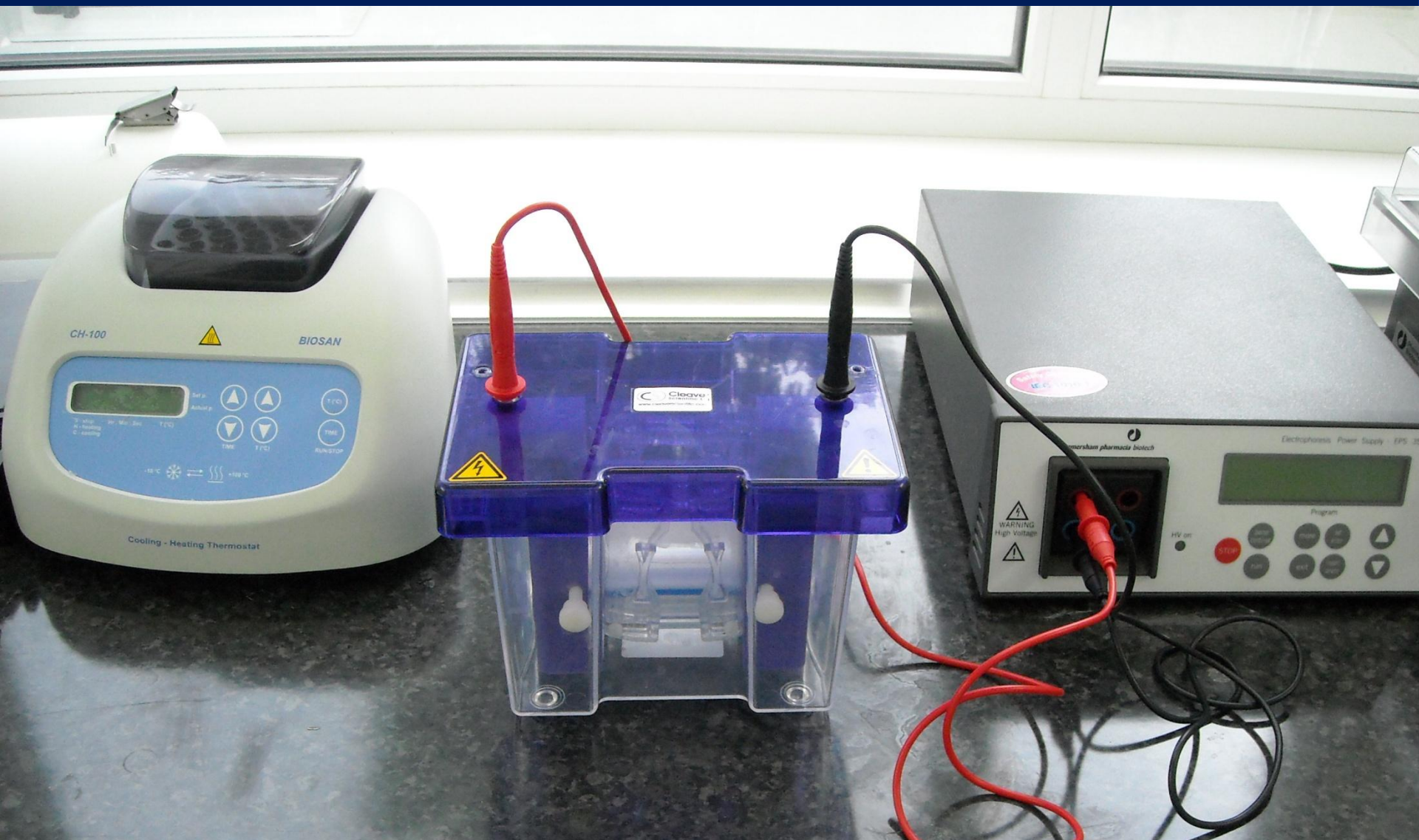


Результаты ГИСТОИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА



Локализация NOS в митохондриях нейронов сенсомоторной зоны мозга крыс на 4-е сутки ОНМК , (Texas Red channel, orig. $\times 200$)(a) ; локализация нитротирозина в митохондриях нейронов сенсомоторной зоны мозга крыс на 4-е сутки ОНМК , (FITC, orig. $\times 200$)(b) ; комбинированное определение NOS и нитротирозина (c)

Метод иммуноблотинга



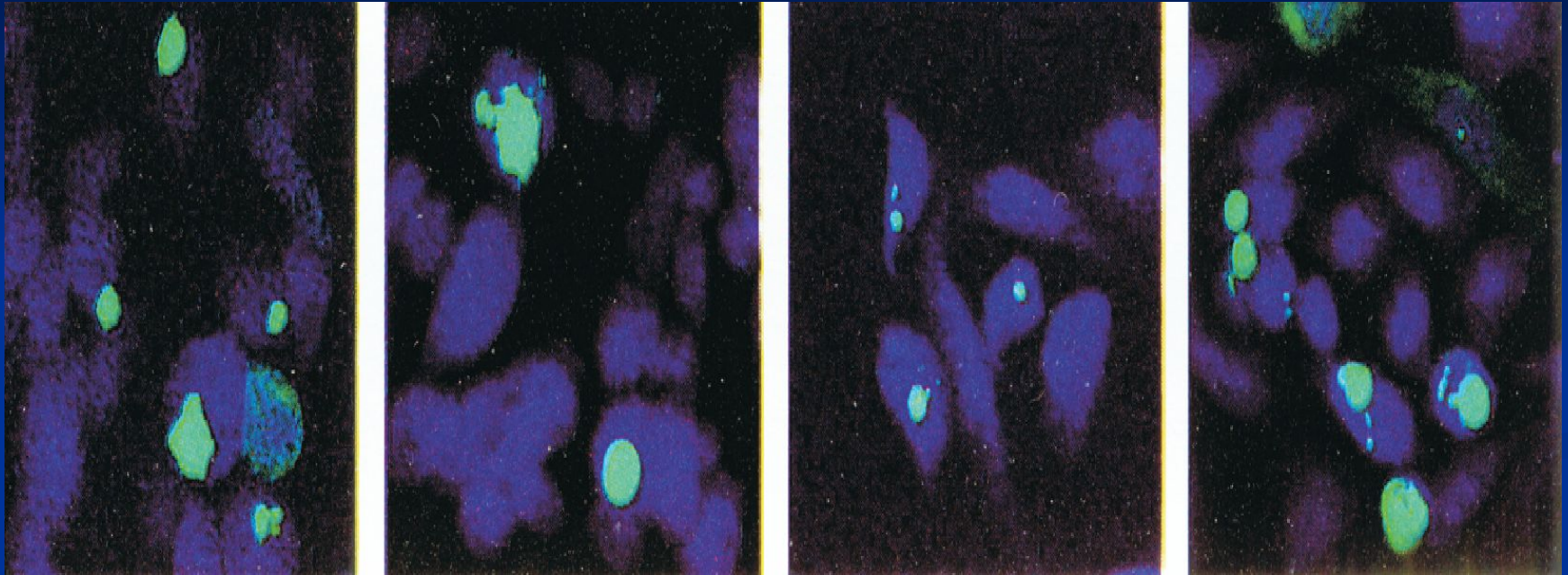
Результаты иммунодетекции HIF 1a



Результаты иммунодетекции HSP 70

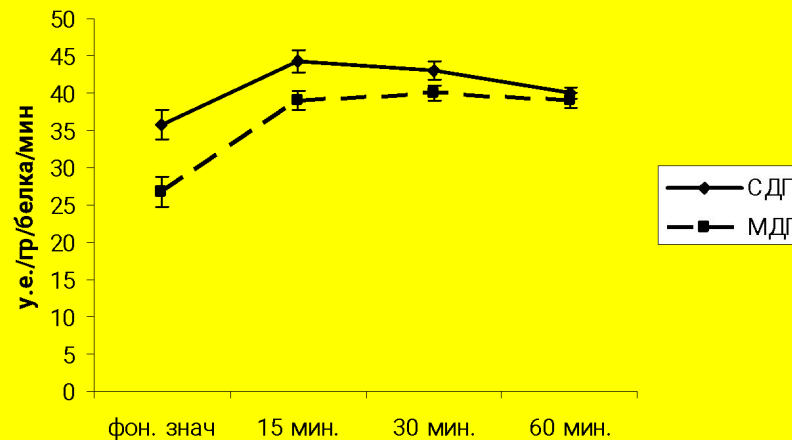
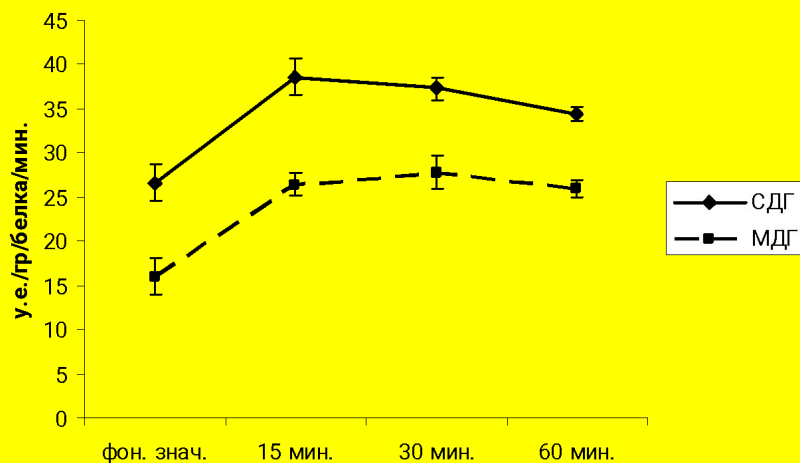


Антиапоптотическое действие HSP 70 (80 мкг/мл)

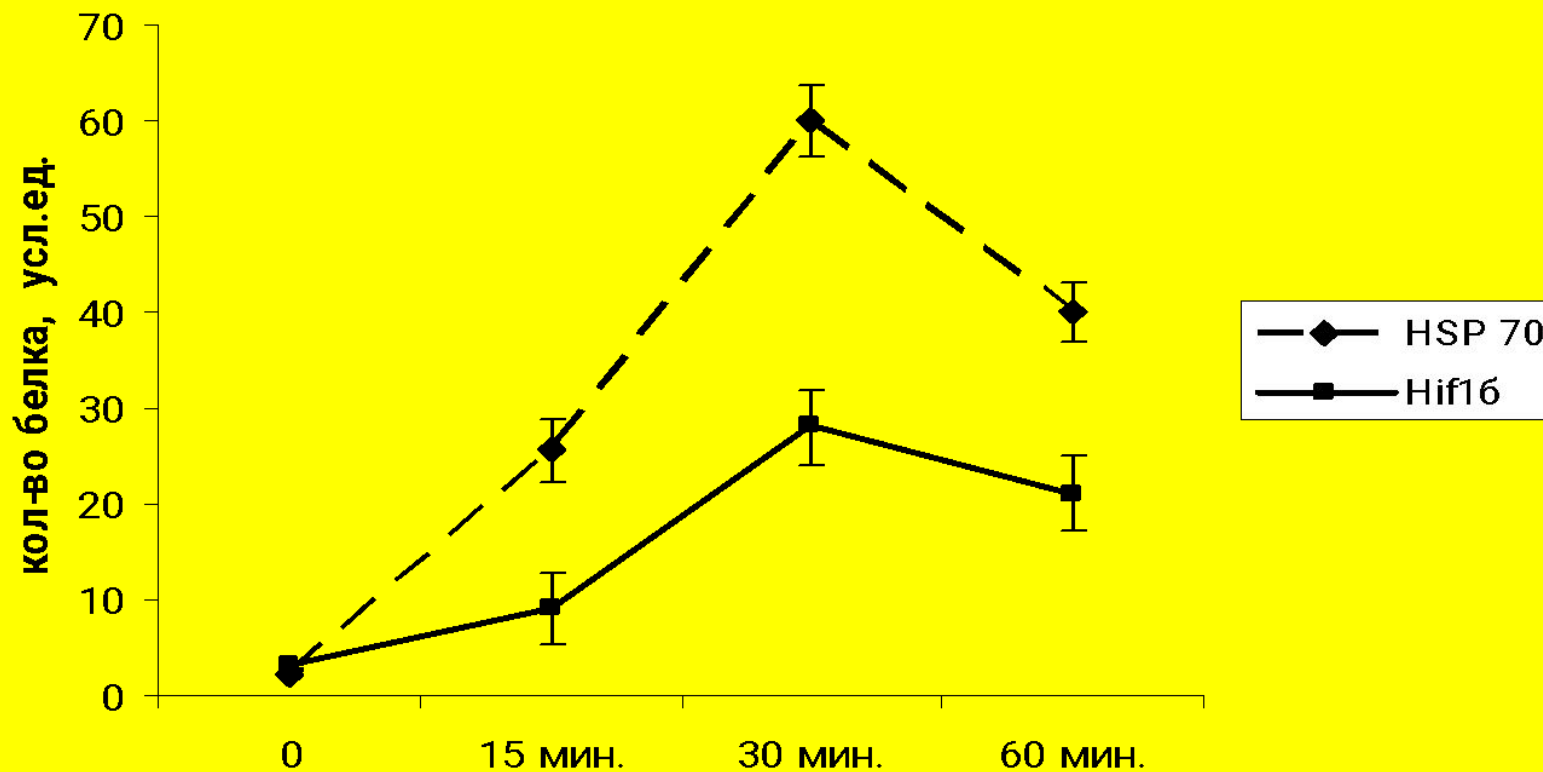


**Hsp70 тормозит домитохондриальный и
митохондриальный части сигналинга апоптоза**

Уровень активности сукцинатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы в цитозольной (А) и митохондриальной (Б) фракциях нейронов, с моделированием МФП-индуцированной гипоксией *in vitro*, на фоне преинкубации с HSP70 (80 мкг/мл)



Нsh70 стабилизирует HIF-1a в митохондриях в условиях церебральной ишемии



*Результаты регрессионного анализа
взаимосвязи НСП и МДГ.*

Молекулярно-биохимические механизмы формирования МД

Мы предполагаем, что в ответ на формирование ишемии головного мозга посредством активации гена раннего реагирования c-fos экспрессируется HIF-1 α , который инициирует запуск компенсаторных механизмов выработки энергии. В дальнейшем регуляция этих процессов переключается на HSP70, который «продолжает» действие HIF-1 α , а также самостоятельно поддерживает экспрессию активности НАД-МДГ-мх, тем самым длительно поддерживая активность малат-аспаратного челночного механизма

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ

Первичная нейропротекция

1. Антагонисты глутаматных рецепторов (NMDA, AMPA).
2. Агонисты ГАМК.
3. Агонисты глициновых рецепторов.
4. Антагонисты потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов.

Вторичная нейропротекция (нейрометаболические церебропротекторы)

1. Модуляторы энергетического метаболизма.
2. Митопротектры
3. Антиоксиданты
4. NO-модуляторы
5. Ноотропы
6. Нейропептиды
7. Вазоактивные препараты
8. Эндотелиопротекторы

Концепция нейропротекции

- Концепция нейропротекции позволяет выделить два основных направления терапии мозгового инсульта. Первичная нейропротекция направлена на прерывание быстрых механизмов некротической смерти клеток — реакций глутамат-кальциевого каскада (антагонисты NMDA и AMPA рецепторов и блокаторы кальциевых каналов

Вторичные нейропротекторы или нейрометаболические церебропротекторы

- Вторичная нейропротекция направлена на уменьшение выраженности отдаленных последствий ишемии – на блокаду провоспалительных цитокинов, молекул клеточной адгезии, торможение оксидативного стресса, нормализацию нейрометаболических процессов, ингибирование апоптоза (антиоксиданты, ноотропы, нейропептиды – цераксон, эмоксипин, тиотриазолин, глицин, пирацетам, тиоцетам, церебролизин, кортексин, цереброкуруин и т.д.)

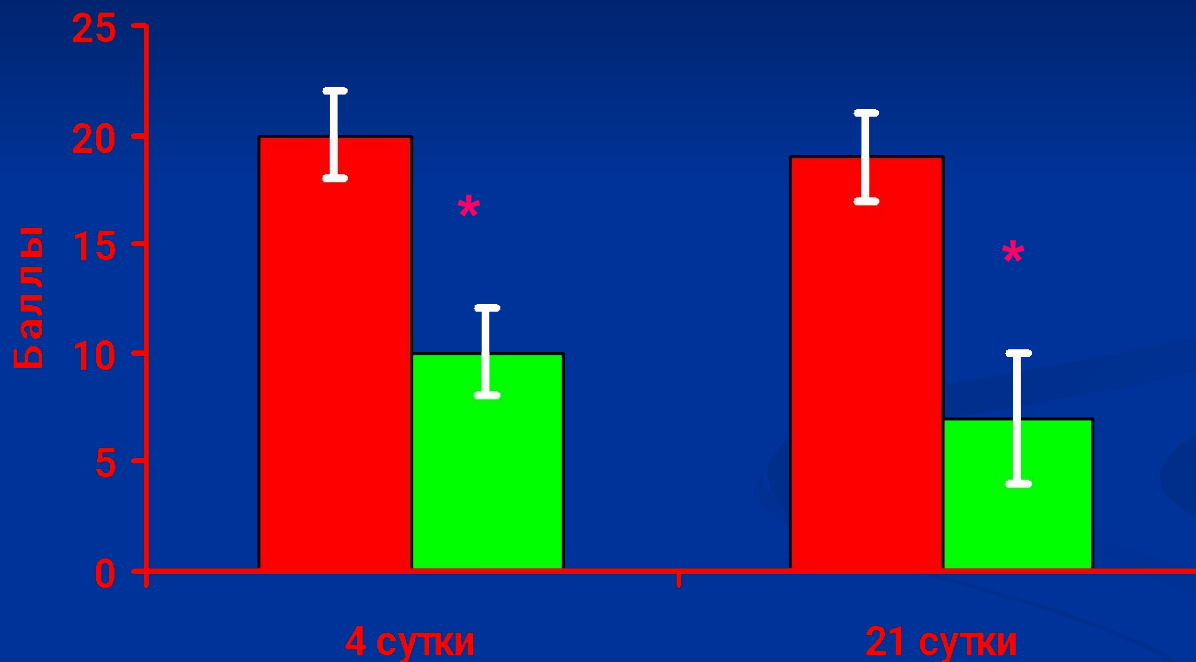
Нейрометаболические церебропротекторы –

лекарственные средства восстанавливающие когнитивно-мнестические функции и снижающие неврологические дефициты, за счет нормализации продуктивной работы митохондрий, уменьшения продукции АФК биоэнергетическими и нейрохимическими системами нейрона и снижение нейроаптоза.

(Ю.Б. Белоусов, 2003;
В.И. Мамчур, 2006)



Влияние Цераксона (250 мг/кг) на развитие неврологического дефицита (средний бал по шкале С.Р. Mc Grow) в различные сроки ОНМК

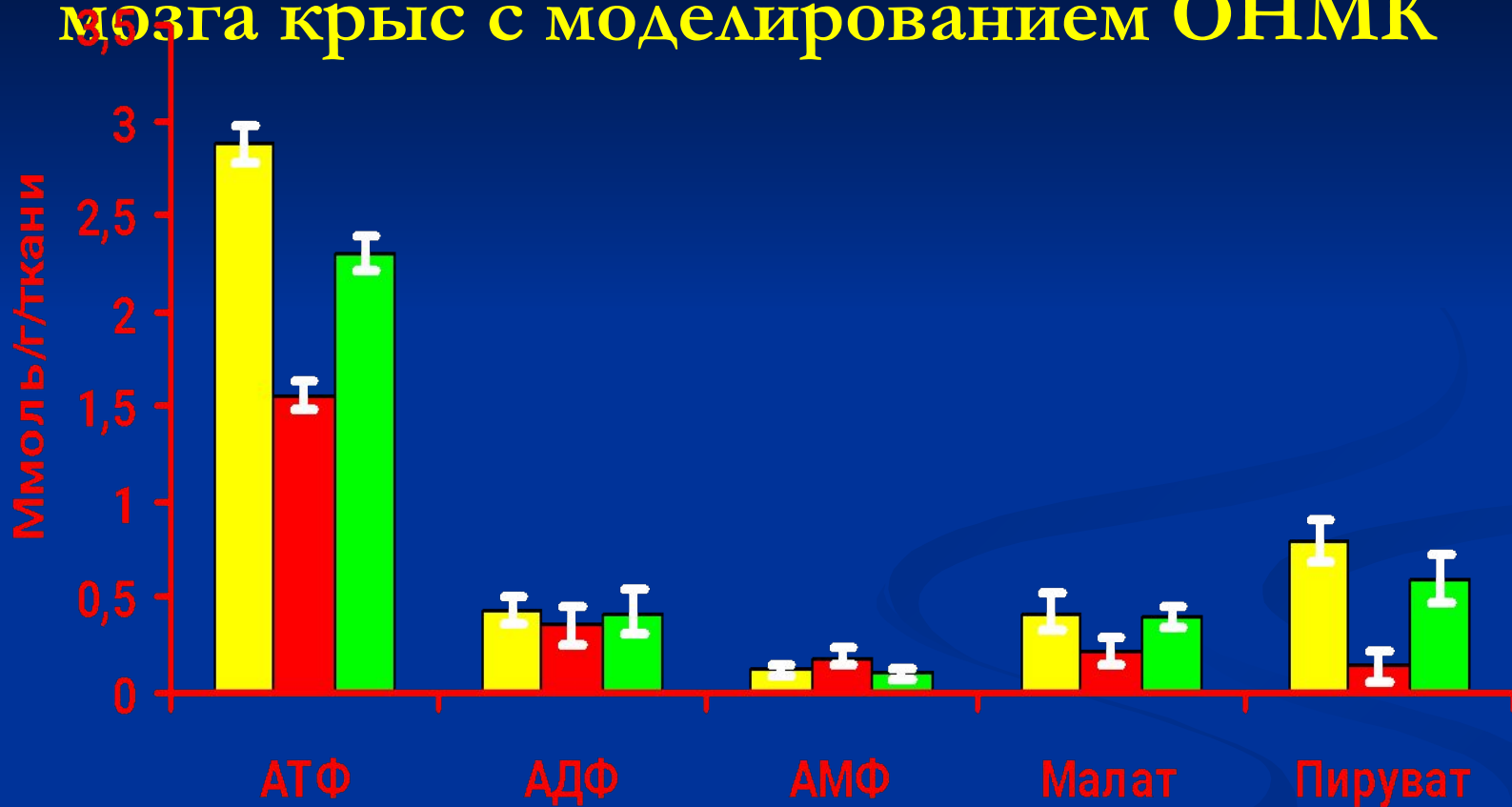


 - Контроль (ишемия)

 - Цераксон^{*} (250 мг/кг)

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

Влияние Цераксона(250 мг/кг) на продукцию энергии в тканях головного мозга крыс с моделированием ОНМК

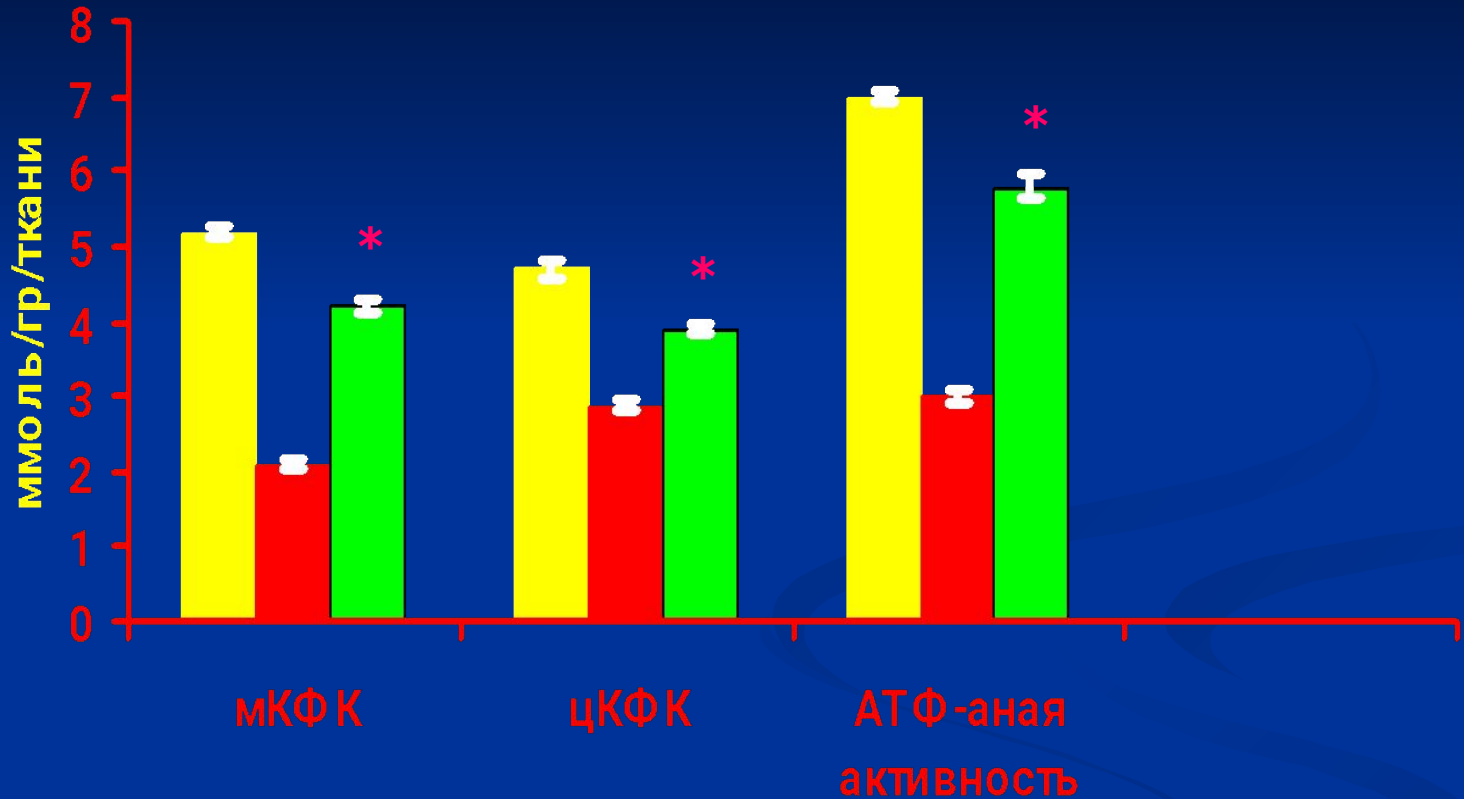


 - Интакт

 - Контроль (ишемия)

 - Цераксон (250 мг/кг)

Влияние Цераксона (250 мг/кг) на транспорт и расход энергии животных с моделированием ОНМК



- Интакт



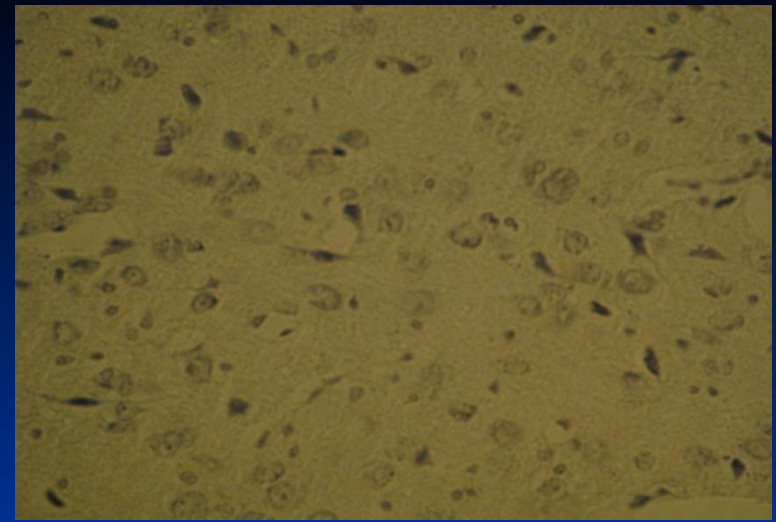
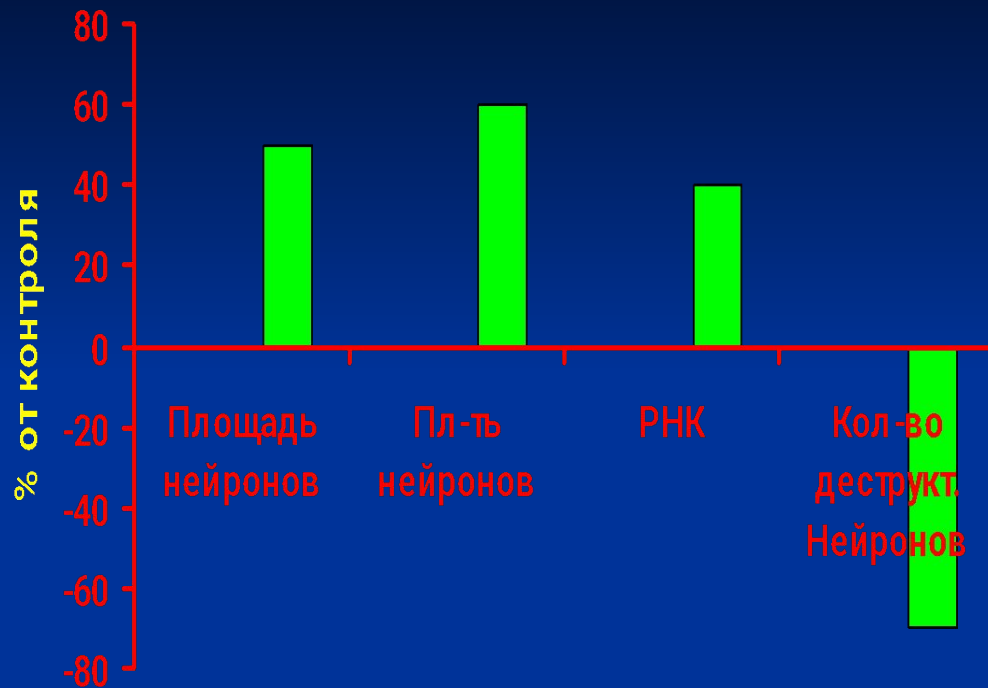
- Цераксон (250 мг/кг)



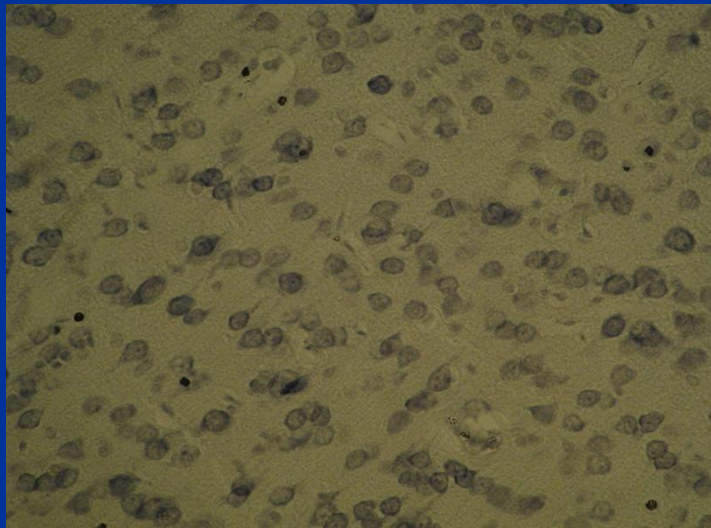
- Контроль (ишемия)

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

Влияние Цераксона на характеристику нейронов IV-V слоев коры головного мозга крыс с экспериментальной ишемией

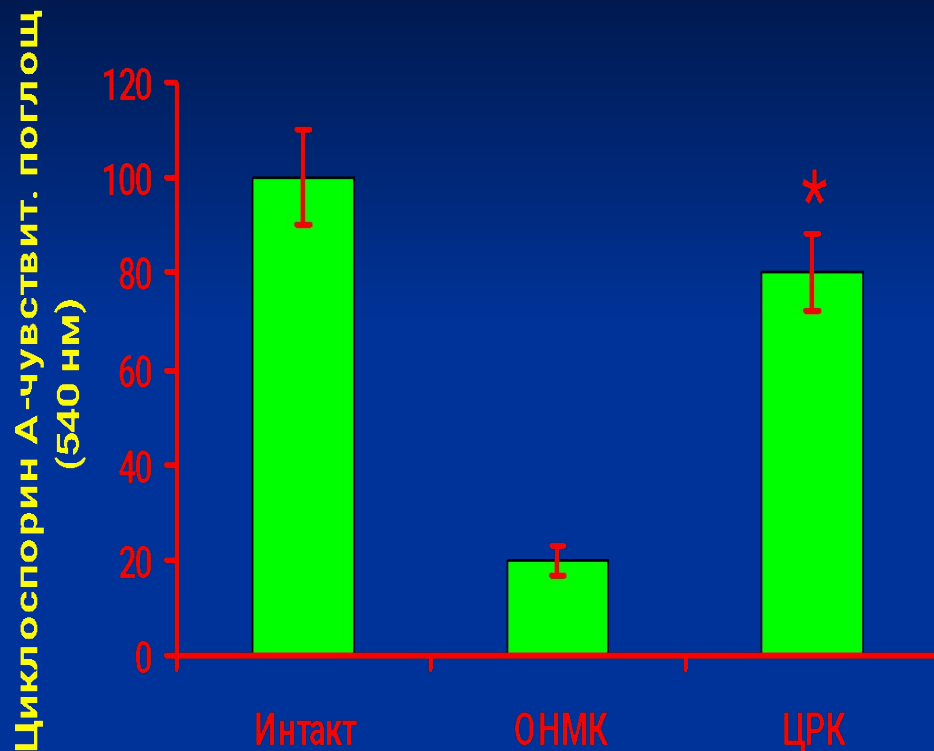


Нейроны IV-V слоев коры головного мозга контрольной группы животных (4-е сутки экспериментальной ишемии)

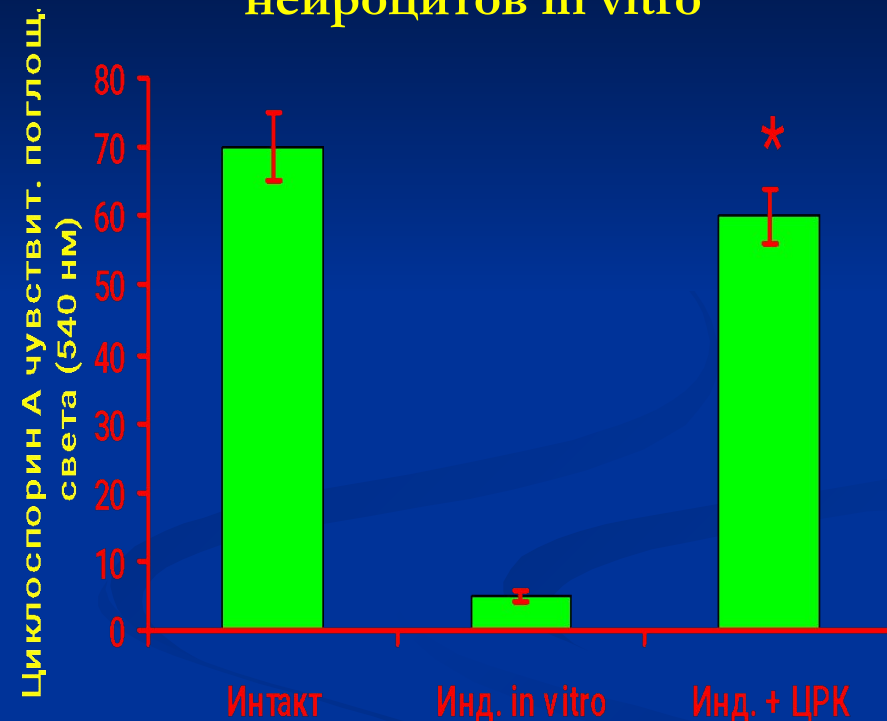


Нейроны IV-V слоев коры головного мозга животных с курсовым назначением (4 суток) **ЦЕРАКСОН**

Влияние Цераксона (250 мг/кг) на открытие митохондриальной поры нейроцитов крыс с ОНМК (4 сутки)



Влияние Цераксона (1 мкг) на индуцированное Ca^{2+} (0,6мМ) и глутаматом (100мкМ) открытие митохондриальной поры нейроцитов *in vitro*



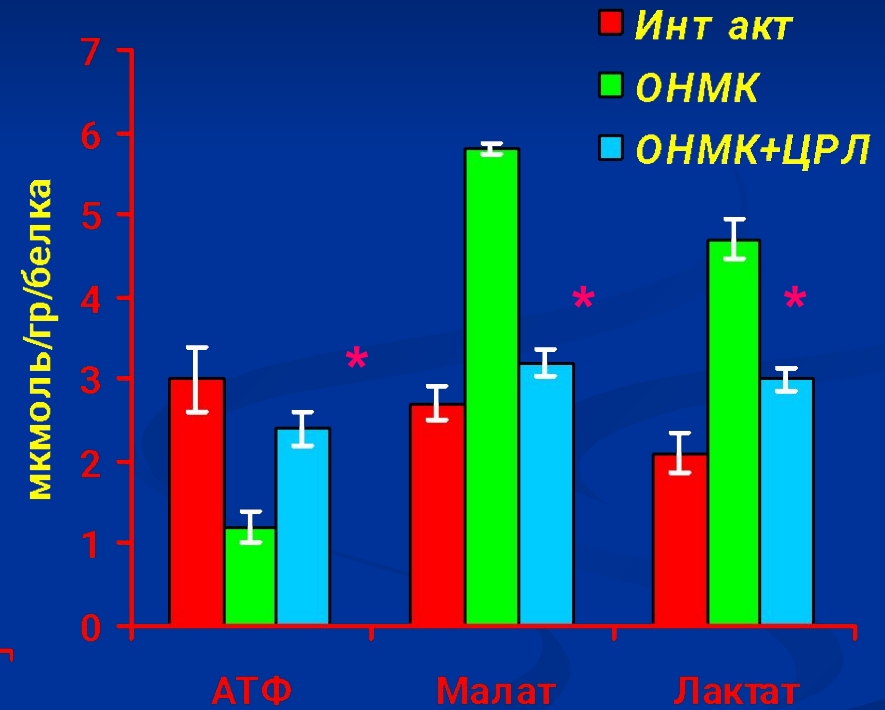
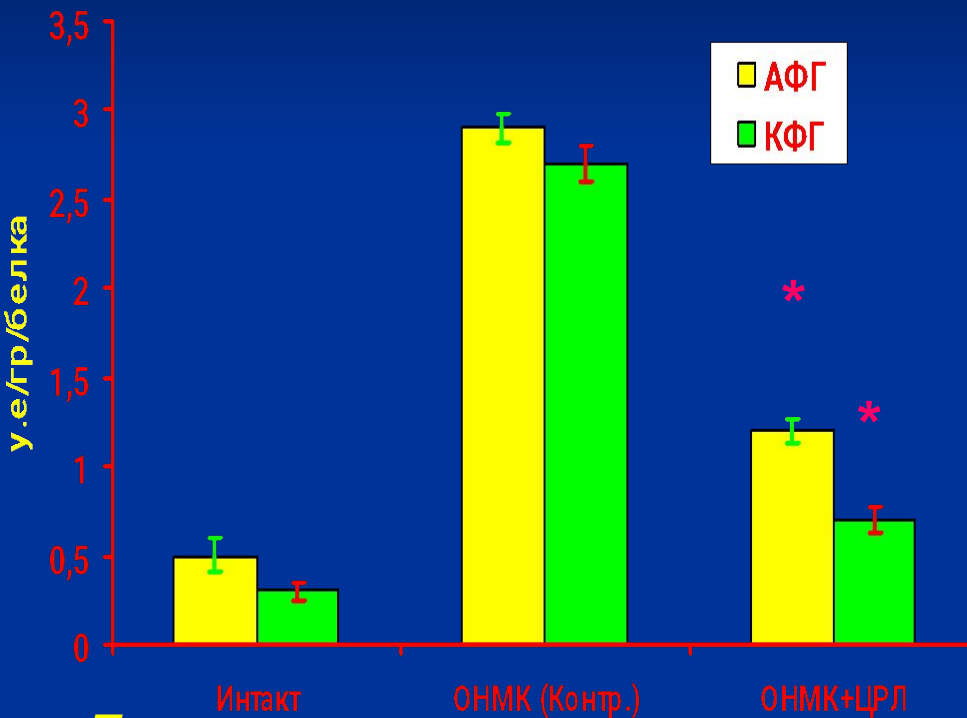
Примечания:

ЦРК – ЦЕРАКСОН

* - $p \leq 0,05$ по отношению к контролю (ОНМК; Индукция *in vitro*)

Окислительная модификация белков в суспензии митохондрий животных, с моделированием ОНМК

Влияние цераксона(250мг/кг) на показатели окислительного метаболизма гололвного мозга у крыс, с моделированием ОНМК



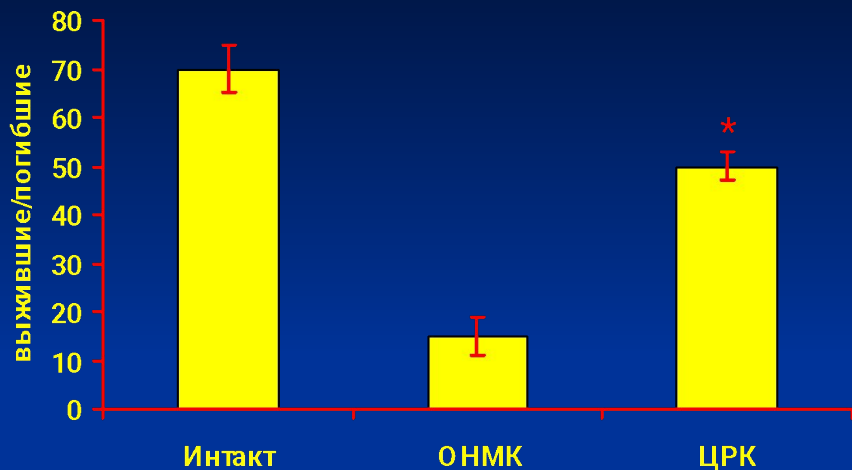
Примечание:

ОНМК- острое нарушение мозгового кровообращения

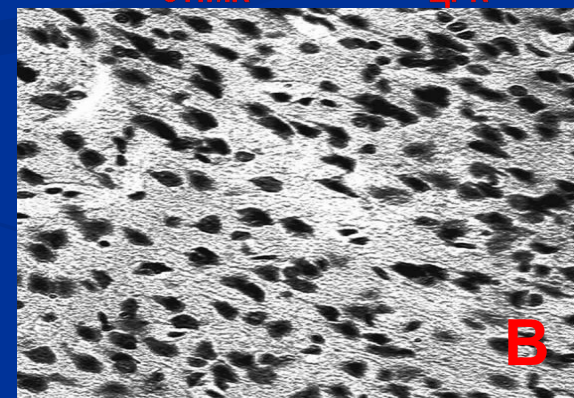
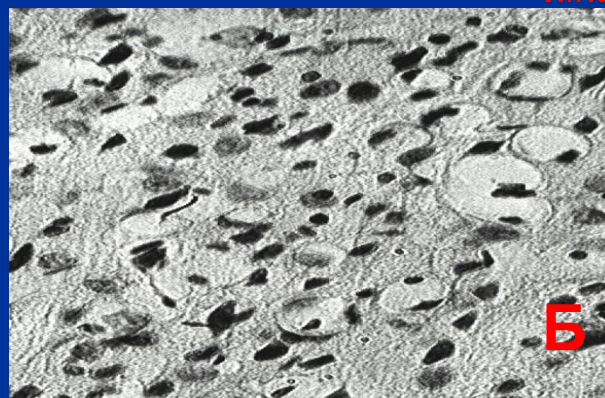
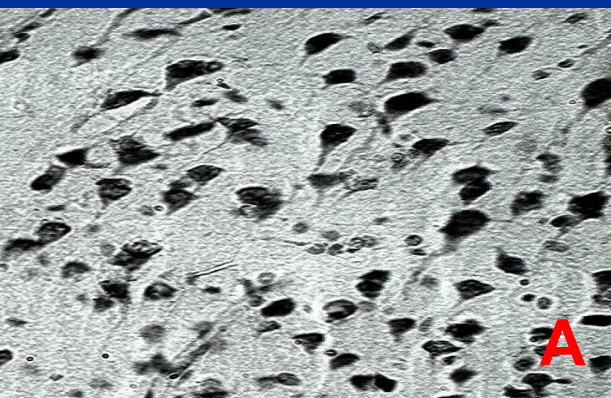
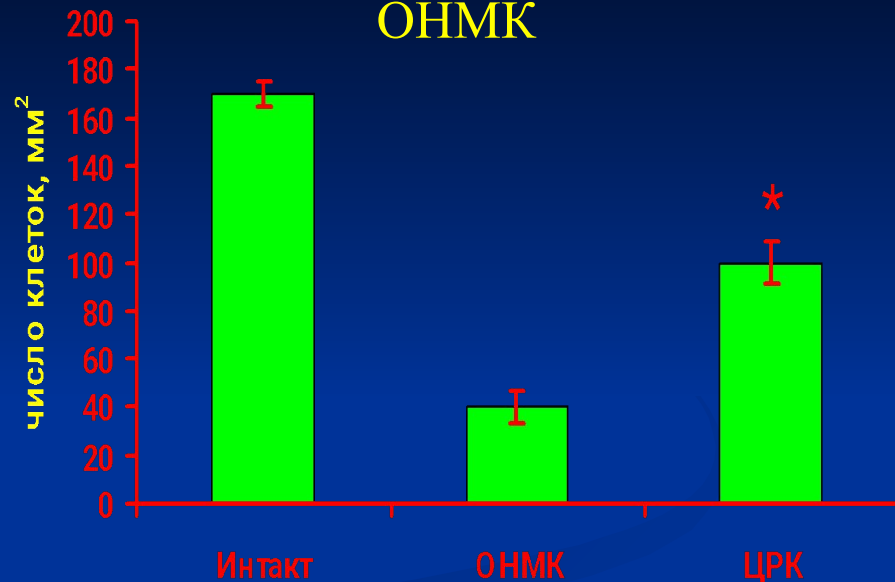
ЦР - ЦЕРАКСОН

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

Индекс выживших/погибших нейронов на мм2 в IV-V слое коры головного мозга у крыс с моделированием ОНМК

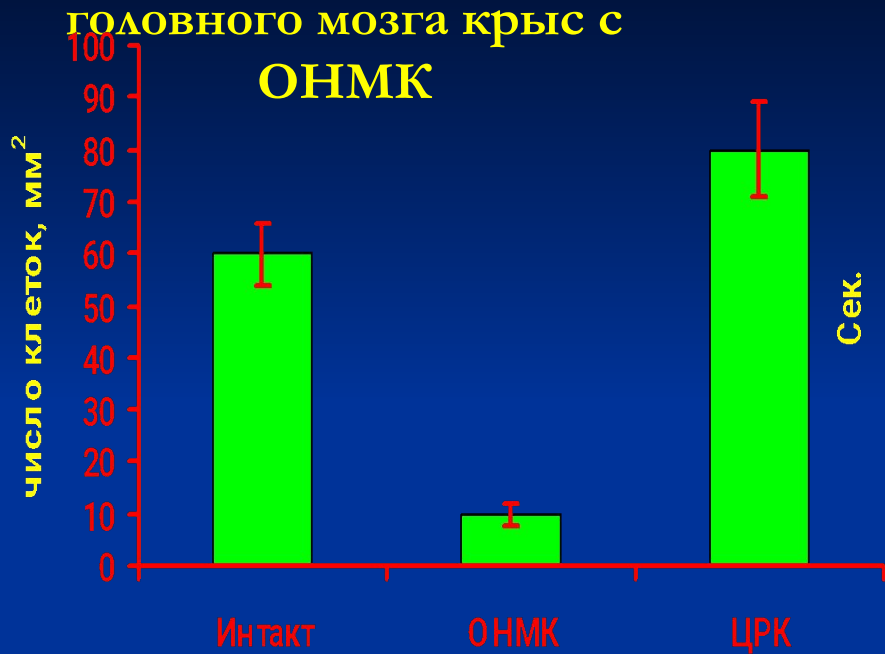


Влияние цераксона(250 мг/кг) на содержание bcl-2 белка в нейронах IV-V слое коры головного мозга крыс с ОНМК

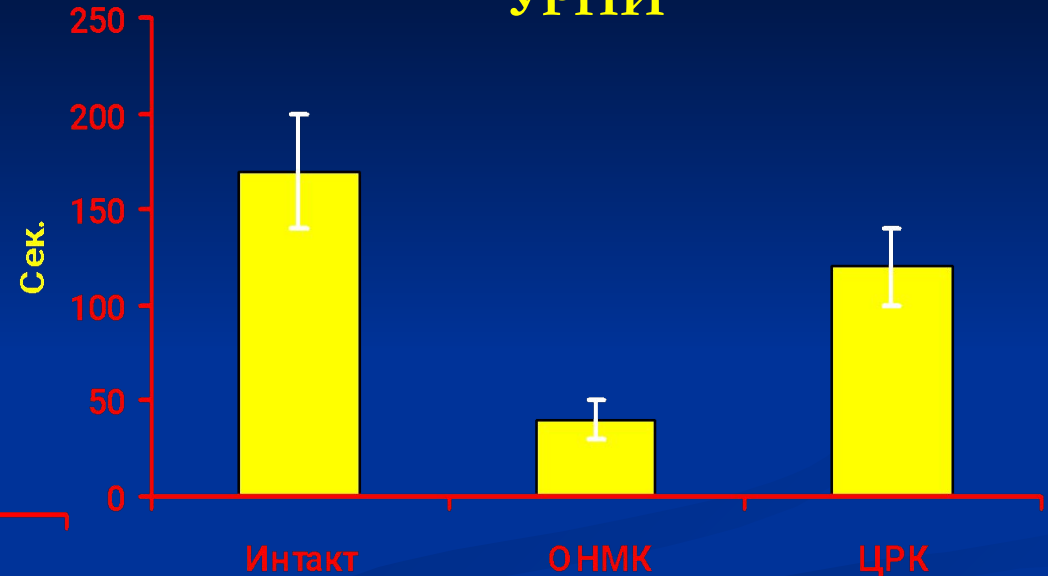


Нейроны сенсомоторной зоны фронтальной коры животных интактной группы (А), и у крыс с ишемией (Б) и введением цераксона (В) на 21-е сутки эксперимента (Окраска галлоцианин-хромовыми квасцами, увеличение $\times 100$).

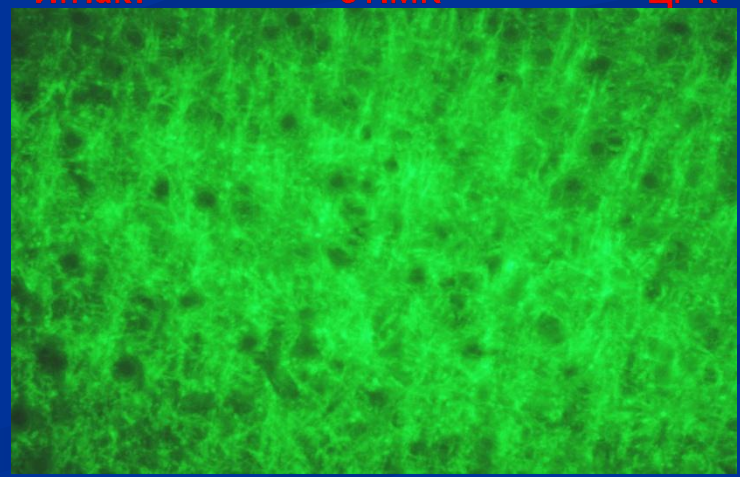
**Влияние Цераксона
(250мг/кг) на экспрессию
гена c-fos в IV-V слое коры**



**Латентное время захода
животных с моделированием
ОНМК в темный отсек в тесте
УРПИ**



А



Б

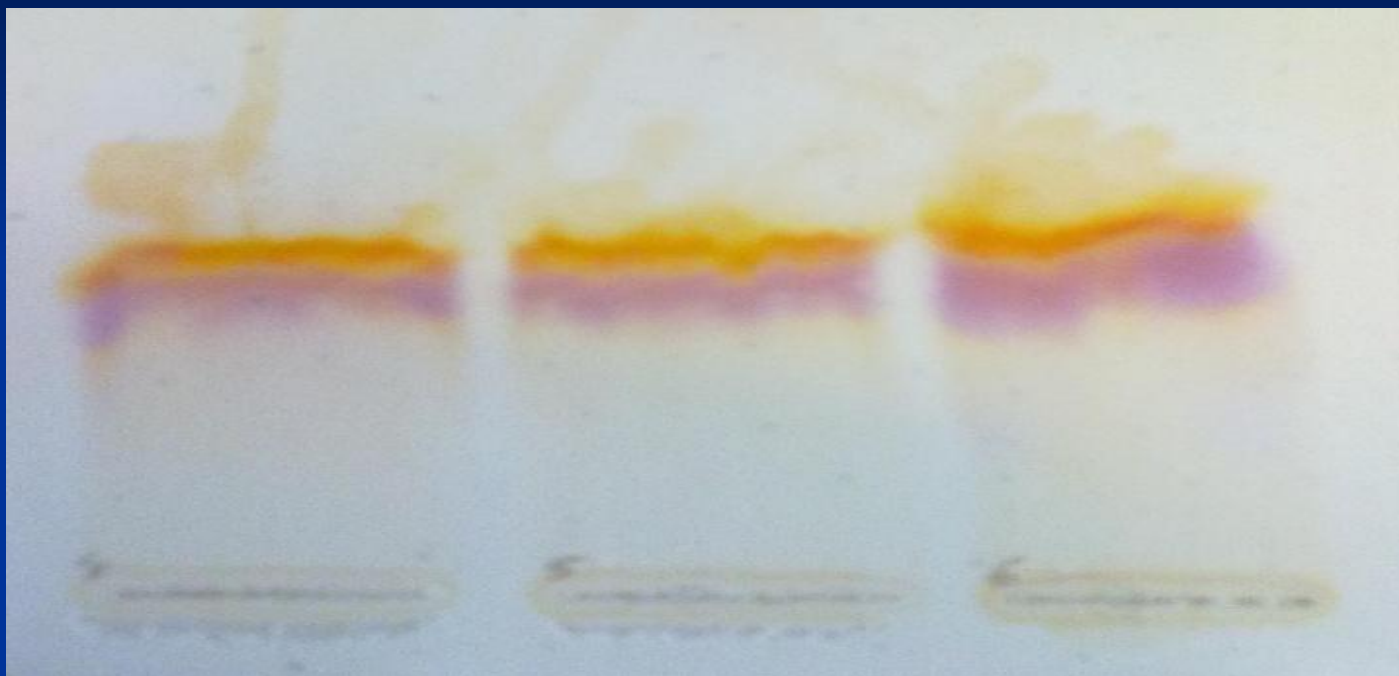
**Экспрессия гена c-fos в IV-V слое коры головного мозга крыс с
ОНМК (А) и у животных с введением Цераксона (Б)**

ОБУЧЕНИЕ



КОНСОЛИДАЦИЯ
ПАМЯТИ

Влияние Цераксона на эксперессию HSP70 в нейронах коры на 4-е сутки ОНМК



Экспрессия белка HSP70 в нейронах сенсомоторной зоны коры крыс (электрофореграмма).

1- контроль; 2-интакт; 3-Цераксон

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!



ЗАПОРІЗЬКИЙ
ЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ