

Министерство образования и науки Российской Федерации  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)  
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (ТГУ)  
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства  
Кафедра физиологии человека и животных

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП

доктор биол. наук

 Д.С. Воробьев

« 9 » июня 2016 г.

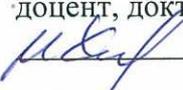
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

ВЛИЯНИЕ ПОЛИПРЕНОЛОВ НА НЕЙРОГЕНЕЗ ПРИ ВЫЗВАННОЙ КУПРИЗОНОМ  
ДЕМИЕЛИНИЗАЦИИ У МЫШЕЙ

По основной образовательной программе подготовки бакалавров  
направление подготовки  
06.03.01 – БИОЛОГИЯ  
Кургин Алексей Александрович

Руководитель ВКР

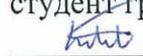
доцент, доктор биол. наук

 М.Ю. Ходанович

« 8 » июня 2016 г.

Автор работы

студент группы № 01201

 А.А. Кургин

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |    |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....  | 2  |
| ВВЕДЕНИЕ .....   | 3  |
| ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....   | 5  |
| 1.1 Современные представления о нейрогенезе .....  | 5  |
| 1.1.1 Нейрогенез взрослого мозга .....   | 5  |
| 1.1.2 Нейрогенные зоны .....   | 6  |
| 1.1.3 Методы исследования нейрогенеза .....  | 7  |
| 1.2 Нейрогенез при демиелинизирующих заболеваниях ЦНС .....                                | 10 |
| 1.2.1 Демиелинизирующие заболевания ЦНС .....  | 10 |
| 1.2.2 Купризоновая демиелинизация как модель рассеянного склероза...                       | 17 |
| 1.2.3 Нейродегенерация при рассеянном склерозе .....                                       | 26 |
| 1.2.4 Нейрогенез при демиелинизации .....  | 29 |
| 1.2.5 Полипrenoлы в качестве возможного модулятора нейрогенеза при<br>демиелинизации ..... | 39 |
| ГЛАВА 2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....  | 43 |
| 2.1 Объект исследования .....  | 43 |
| 2.2 Схема эксперимента .....   | 43 |
| 2.3 Иммуногистохимическое окрашивание срезов .....   | 44 |
| 2.4 Статистический анализ .....  | 45 |
| ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....  | 46 |
| 3.1 Субвентрикулярная зона .....   | 46 |
| 3.2 Гранулярный слой клеток зубчатой извилины гиппокампа .....                             | 48 |
| 3.3 Хилус зубчатой извилины гиппокампа .....   | 50 |
| 3.4 Обсуждение результатов .....   | 51 |
| Выводы .....   | 53 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....   | 54 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛД – адренолейкодистрофия

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГЭБ – гемато-энцефалический барьер

ДХ – долихол

ДФЦ – долихолфосфатный цикл

ММП – матриксные металлопротеиназы

МРТ – магнитно-резонансная томография

МФА – метод флуоресцирующих антител

нМФА – непрямой метод флуоресцирующих антител

ОРЭМ – острый рассеянный энцефаломиелит

пМФА – прямой метод флуоресцирующих антител

ПНС – периферическая нервная система

ПП – полипренол

РС – рассеянный склероз

ТСП – тропический спинальный парапарез

ЭАЭ – экспериментальный аллергический энцефаломиелит

ДСХ – даблкортин

DG (*dentatus gyrus*) – зубчатая извилина

НАА – N-ацетиласпартат

NGF – фактор роста нервов

PBR – периферический бензодиазепиновый рецептор

SVZ (*subventricular zone*) – субвентрикулярная зона

## **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время демиелинизирующие и нейродегенеративные заболевания поражают людей трудоспособного возраста, приводят к ранней инвалидизации заболевших и представляют серьезную медико-социальную проблему.

Принципиальный вклад в изучение патогенетических механизмов при нейродегенеративных и демиелинизирующих заболеваниях внесло моделирование этих процессов на животных. Рассеянный склероз имеет много схожих черт с интоксикацией купризоном, поэтому она представляет собой превосходную модель для изучения патологий и терапии заболеваний человека.

При рассеянном склерозе поражается миелиновая оболочка нервных волокон головного и спинного мозга. Особенностью болезни является одновременное поражение нескольких различных отделов нервной системы, что приводит к появлению у больных разнообразных неврологических симптомов. Причина возникновения рассеянного склероза точно не выяснена. На сегодняшний день наиболее общепринятым является мнение, что рассеянный склероз может возникнуть в результате взаимодействия ряда неблагоприятных внешних и внутренних факторов.

Строительными белками, участвующими в поддержании сохранности миелиновой оболочки нервов, являются гликопротеины. В патогенезе многих заболеваний ведущую роль играют дисбаланс и дефицит гликопротеинов, что чаще всего бывает обусловлено нарушением процессов гликозилирования белков в долихолфосфатном цикле, а именно нехваткой активного долихолфосфата. В результате исследований, выполненных в Стокгольме под руководством профессора Густава Далнера, доказано, что введенный в организм полипренол преобразуется в долихолфосфат и выполняет функцию последнего в синтезе гликопротеинов, в том числе при нарушении

долихолфосфатного цикла. Таким образом, вероятно, растительный полипренол может быть использован для заместительной профилактики и терапии при дефиците долихолфосфатного цикла.

**Целью** данной работы является изучение влияния полипренолов на уровень нейрогенеза в экспериментальной модели вызванной купризоном демиелинизации у мышей.

**Задачи:**

1. Изучить влияние, оказываемое купризоновой демиелинизацией, на нейрогенез в основных нейрогенных зонах головного мозга.
2. Изучить влияние, оказываемое естественной ремиелинизацией, на нейрогенез в основных нейрогенных зонах головного мозга на фоне вызванной купризоном демиелинизации.
3. Изучить влияние, оказываемое полипренолами, на нейрогенез в основных нейрогенных зонах головного мозга на фоне вызванной купризоном демиелинизации.

# ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1 Современные представления о нейрогенезе

### 1.1.1 Нейрогенез взрослого мозга

Мозг обладает большими компенсаторными возможностями благодаря свойству нейропластичности – способности перестраивать структурно-функциональную организацию в ответ на действие экзогенных и эндогенных факторов и восстанавливать нарушение функций после повреждений различного генеза.

Вплоть до 90-х годов XX века во всем мире существовало стойкое убеждение, что нейрональные сети взрослого мозга статичны и неспособны к регенерации. Хотя еще в 1962 году американский нейробиолог Джозеф Альтман обнаружил что в гиппокампе крысы происходит образование новых нейронов, постнатальный нейрогенез, как факт, был признан гораздо позже [13].

Нейрогенез у взрослых – это явление, относительно недавно признанное научным сообществом, которое опровергло существовавшую долгое время научную теорию о статичности нервной системы и её неспособности к регенерации. В течение многих лет только небольшое число нейробиологов рассматривало возможность нейрогенеза. Однако, в последние десятилетия, благодаря развитию иммуногистохимических методов и конфокальной микроскопии, сначала было признано наличие нейрогенеза у певчих птиц, а затем были получены неоспоримые доказательства нейрогенеза в субвентрикулярной зоне и субгранулярной зоне (части зубчатой извилины гиппокампа) у млекопитающих и в том числе у людей. Некоторые авторы предполагают, что образование новых нейронов у взрослых также может происходить и в других областях мозга, включая

неокортекс приматов, другие ставят под вопрос научность этих исследований, а некоторые считают, что новые клетки могут оказаться глиальными клетками [8].

Нейрогенез у взрослых является одним из механизмов пластичности мозга, выражающихся в увеличении количества нейронов и структурной перестройке нейрональных сетей, образовании новых синапсов и изменении синаптической передачи. Добавление новых клеток в обонятельные луковицы и в зубчатую извилину гиппокампа заканчивается функциональной интеграцией клеток с уникальными характеристиками. Например, молодые гранулярные клетки в зубчатой извилине имеют более низкий порог долговременной потенциации, чем более старые клетки. Предполагается, что эта пластичность важна для процессов обучения и памяти.

### **1.1.2 Нейрогенные зоны**

Нейрогенез во взрослом мозге обнаружен лишь в нескольких строго определенных зонах. Одна из них – субвентрикулярная зона – область, выстилающая изнутри боковые стенки боковых желудочков мозга (данные получены на крысах). В процессе развития млекопитающих (эмбриональная стадия) нейроны формируются из слоя клеток, выстилающих желудочки (вентрикулярные зоны), затем поделившиеся клетки мигрируют в различные области, формируя все структуры мозга. Субвентрикулярная зона находится ниже вентрикулярной и содержит клетки, способные делиться во взрослом мозге. Нейрогенез в этой зоне инициируется беременностью (мыши и крысы). У грызунов обоняние критично для узнавания и воспитания детенышей. К моменту родов в обонятельной луковице самки (область мозга, принимающая информацию с рецепторов носа; активируется в ответ на запахи) появляются новые клетки, мигрировавшие из субвентрикулярной

зоны. Эти клетки встраиваются в уже существующие сети и развиваются в зрелые нейроны [8].

Другая область взрослого мозга, где присутствуют скопления клеток способных к делению – гиппокамп. Эта область получает информацию из коры больших полушарий. Считается, что чем необычнее информация, тем выше его активность. Гиппокамп отправляет свое возбуждение по всему мозгу, создавая локальные очаги активации, тем самым облегчая переработку информации. В экспериментах на крысах обнаружено, что у животных, постоянно получающих новые игрушки, выживание вновь рожденных клеток выше, чем в контроле (крысы безо всяких игрушек). В то время как у крыс, живущих в изоляции, нейрогенез гиппокампа снижен. В обучающих экспериментах на крысах было обнаружено, что обучение сопровождается появлением новых нейронов в гиппокампе.

Процесс формирования новых нейронов в гиппокампе подавляется, если животное оказывается беспомощным перед неизбежной угрозой или находится в состоянии хронического стресса. По-видимому, подавление активности выражается на уровне мозга в ослаблении нейрогенеза гиппокампа. Процесс восстанавливается спонтанной физической активностью [38].

### **1.1.3 Методы исследования нейрогенеза**

Расширение наших знаний о течении нейрогенеза у людей взрослого возраста прямо коррелирует с набором методов, которые могут быть применены для исследования тканей головного мозга человека. Существует ряд методов, однако все они разнятся по чувствительности, специфичности и единицам количественного оценивания, что затрудняет сравнение различных исследований между собой. Кроме того, ряд методов позволяет оценить только пролиферацию (NPCs или общее количество

пролиферирующих клеток), в то время как другие позволяют получить данные о нейрогенезе (нейробласты (NBs, клетки, коммитированные в нейроны) или новообразованные нейроны) [14].

Для лечения многих нейродегенеративных заболеваний изучение процессов контроля ремиелинизации на локальном и системном уровне позволит использовать ремиелинизацию в качестве терапевтического подхода. Для качественного и количественного анализа клеток в подобных исследованиях пользуются иммуногистохимическими методами [11].

Имуногистохимическое исследование – метод микроскопического исследования тканей, обеспечивающий наиболее специфическое выявление в них искомым веществ и основанный на обработке срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веществу, которое в данной ситуации служит антигеном [2].

Имунофлуоресцентный анализ (МФА – метод флуоресцирующих антител, иммунофлуоресценция) (англ. Immunofluorescence) – набор иммунологических методов для качественного и количественного определения поверхностных и внутриклеточных антигенов в образцах клеточных суспензий, образцов крови, костного мозга, альвеолярных смывов, тонких тканевых срезов. Метод позволяет детально анализировать биологические образцы на присутствие определенных антигенных детерминант, характерных для определенных возбудителей или заболеваний, проводить количественную оценку как поверхностных, так и внутриклеточных белков, и рецепторов. Исследование и оценка может выполняться вручную при помощи флуоресцентного микроскопа или автоматизировано с использованием проточного цитометра или микрочипового цитометра. Основными практическими приложениями являются онкология, микробиология, клеточная биология, генетика, фармакология и др. [24].

Сущность метода заключается в визуализации антигена специфическими антителами с флуоресцентными маркерами. Метод конъюгации глобулинов с органическими флуорохромами разработан в 1942 году А. Кунсом. В настоящее время метод использует как антитела к различным антигенам, так и специфические красители к ДНК (к примеру, DAPI), РНК (к примеру, SybrGreen II), липидам и белкам [23].

В базовой МФА методике различают прямой метод, разработанный А. Кунсом и Мелвином Капланом, и непрямой, разработанный А. Кунсом и Уиллером в первоначальном варианте непрямого МФА с комплементом. При прямом методе (пМФА) на исследуемый препарат или в суспензию клеток наносят раствор прямо меченых флуоресцентным красителем антител. Образование комплекса антиген-антитело обнаруживается флуоресцентным сигналом в виде свечения разной степени интенсивности и четкости. При непрямом методе (нМФА) на препарат наносят антитела против искомым антигенов (т. н. «первые» антитела), а затем видоспецифичные «вторые» антитела против «первых» антител, что позволяет избежать неспецифических реакций. При этом только вторые антитела конъюгированны с флуоресцентным красителем. К примеру, если при исследовании в качестве «первых» антител используются мышинные антитела – mouseIgG, то в качестве «вторых» используются антивидовые anti-mouseIgG, конъюгированные с флуоресцентным красителем. Комплекс антиген-антитело дает флуоресцентное окрашивание только после связывания со «вторым» антителом [24].

В качестве маркера нейрогенеза, благодаря его уникальному паттерну экспрессии, используется даблкортин – белок, ассоциированный с микротрубочками, экспрессируемый почти исключительно незрелыми нейронами.

Нейрональные клетки-предшественники начинают производить DCX вскоре после входа в клеточный цикл с затуханием экспрессии через 2-3 недели, ко времени окончательного превращения в развитые нейроны [25].

Метод флуоресцирующих антител имеет решающее значение в ранней диагностике и лечении онкологических, а также нейродегенеративных заболеваний, диагностике инфекционных заболеваний и наследственных синдромов.

## **1.2. Нейрогенез при демиелинизирующих заболеваниях ЦНС**

### **1.2.1 Демиелинизирующие заболевания ЦНС**

Заболевания, одним из основных проявлений которых является разрушение миелина, – одна из наиболее актуальных проблем. В последние годы наблюдается отчетливое увеличение числа случаев заболеваний, сопровождающихся повреждением миелина [44].

Разрушение миелина является универсальным механизмом реакции нервной ткани на повреждение.

Болезни миелина подразделяются на две основные группы:

- миелинопатии – связаны с биохимическим дефектом строения миелина, как правило, генетически обусловленным;
- миелинокластии – в основе миелинокластических (или демиелинизирующих) заболеваний лежит разрушение нормально синтезированного миелина под влиянием различных воздействий, как внешних, так и внутренних.

#### *Наследственные миелинопатии*

Клинические проявления большинства этих заболеваний чаще отмечаются уже в детском возрасте. В то же время имеется ряд заболеваний, которые могут начинаться в более позднем возрасте [9].

Адренолейкодистрофии (АЛД) связаны с недостаточностью функции коры надпочечников и характеризуются активной диффузной демиелинизацией различных отделов как ЦНС, так и ПНС. Основной генетический дефект при АЛД связан с локусом на X-хромосоме - Xq28, генетический продукт которого (белок ALD-P) является пероксисомальным мембранным белком. Тип наследования в типичных случаях - рецессивный, зависимый от пола. В настоящее время описано более 20 мутаций в разных локусах, связанных с разными клиническими вариантами АЛД. Основным метаболическим дефектом при этом заболевании - увеличение содержания в тканях насыщенных жирных кислот с длинной цепью (особенно С-26), что приводит к грубым нарушениям структуры и функций миелина. Наряду с дегенеративным процессом в патогенезе болезни существенное значение имеет хроническое воспаление в ткани мозга, связанное с повышенной продукцией фактора некроза опухолей альфа (ФНО-α). Фенотип АЛД определяется активностью этого воспалительного процесса и вероятнее всего обусловлен как различным набором мутаций на X-хромосоме, так и аутомсомной модификацией влияния дефектного генетического продукта, т.е. сочетанием основного генетического дефекта в половой X-хромосоме со своеобразным набором генов на других хромосомах [9].

Клинические варианты адренолейкодистрофий можно разделить на две основные группы:

- преимущественно церебральные формы;
- преимущественно полиневропатические, развивающиеся чаще у взрослых.

Среди более редких полиневритических форм выделяют адреномиелоневропатию, которая может начинаться в возрасте 25 - 35 лет. В последнее время все большую роль в мониторинге активности патологического процесса при различных вариантах АЛД приобретают магнитно-резонансная томография. Эффективного специфического лечения АЛД пока нет, проводится симптоматическая терапия. Сейчас

разрабатываются подходы к проведению генетического консультирования как метода профилактики АЛД на основе скрининга мутаций в гене белка ALD и других локусах для выявления носительниц патогенных мутаций [9].

Описана поздняя форма суданфильной лейкодистрофии Пелицеуса-Мерцбахера с началом заболевания на втором десятилетии жизни. Выраженное демиелинизирующее поражение головного мозга у этих больных сопровождается снижением содержания эфиров холестерина. У этих больных прогрессивно нарастают нарушения координации, спастические парезы, интеллектуальные нарушения. Поздние формы этой лейкодистрофии имеют часто благоприятное течение, и их, как правило, очень сложно дифференцировать от рассеянного склероза [9].

Болезнь Александра – редкое заболевание, преимущественно наследуемое по аутосомно-рецессивному типу входит в группу лейкодистрофий которые характеризуются демиелинизацией с диффузной волокнистой дегенерацией белого вещества головного мозга и образованием в ткани мозга глобоидных клеток. Эта дисмиелинопатия характеризуется тем, что в миелине вместо галактолипидов и цереброзидов накапливаются глюколипиды. В ткани мозга при болезни Александра помимо диффузной демиелинизации выявляются полости и гиалиновые уплотнения волокон вокруг сосудов мозга. Заболевание может начинаться в любом возрасте, на ранних стадиях возможно ремиттирующее течение. Прогноз крайне неблагоприятный, хотя и описаны медленно прогрессирующие варианты, близкие по течению к рассеянному склерозу [9].

К группе глобоидо-клеточных лейкодистрофий также относятся такие редкие заболевания, как болезнь Краббе и болезнь Канавана. Эти заболевания редко развиваются во взрослом возрасте. Клинически они характеризуются прогрессирующим поражением миелина разных отделов ЦНС с развитием парезов, нарушений координации, деменции, слепоты, эпилептическим синдромом. Исследования лейкоцитов крови или

фибробластов кожи часто выявляют дефицит фермента б-галактоцереброзидазы. В разном возрасте могут начинаться так называемые болезни митохондрий с поражением ЦНС и развитием митохондриальных лейкоэнцефалопатий. Различные мутации, в том числе в митохондриальной ДНК, могут вызывать ферментативные дефекты и нарушать процессы транспорта и утилизации веществ, сохранения и передачи энергии, нарушать дыхательную цепь. Для митохондриальных энцефалопатий характерно повышение содержания лактата и пирувата в плазме крови и спинномозговой жидкости, в митохондриях. Эти нарушения могут приводить к развитию полиморфной неврологической симптоматики, иногда сходной с симптомами рассеянного склероза.

#### *Миелинокластические заболевания*

Среди миелинокластических заболеваний особого внимания заслуживают вирусные инфекции, в патогенезе которых большое значение имеет разрушение миелина. Это в первую очередь:

- нейроСПИД, вызываемый вирусом иммунодефицита человека, и связанные с ним поражения нервной системы;
- тропический спинальный парапарез (ТСП), вызываемый ретровирусом HTLV-I.

Патогенез первичного поражения ЦНС при нейроСПИДе связан с непосредственным нейротоксическим воздействием вируса, а также с патологическим действием цитотоксических Т-клеток, противомозговых антител и нейротоксических веществ, вырабатываемых инфицированными иммунными клетками. Прямое поражение мозга при ВИЧ-инфекции приводит к развитию подострого энцефалита с участками демиелинизации. При этом в ткани мозга могут быть выявлены моноциты и макрофаги с большим количеством вируса. Эти клетки сливаются в гигантские многоядерные образования с огромным количеством вирусного материала (синцитии), что и явилось причиной обозначения этого энцефалита как гигантоклеточного. В

то же время характерным для этой инфекции является несоответствие тяжести клинических проявлений и выраженности патоморфологических изменений. У многих больных с отчетливыми клиническими проявлениями ВИЧ-ассоциированной деменции патоморфологически может выявляться только "побледнение" миелина и слабовыраженный центральный астроглиоз [3].

Хроническое воспаление в белом веществе мозга с развитием демиелинизации характерно для ТСП (тропического спинального парапареза) или HTLV-1 миелопатии. Это эндемическое для стран Юго-Восточной Азии заболевание характеризуется неуклонно прогрессирующим нижним парапарезом. При проведении МРТ у больных с ТСП могут выявляться и субклинические очаги демиелинизации в головном мозге. Диагностическое значение имеет выявление ретровируса HTLV-I или антител к нему. У лиц с кахексией, страдающих хроническим алкоголизмом, тяжелыми хроническими заболеваниями печени и почек, при диабетическом кетоацидозе, при проведении реанимационных мероприятий может развиваться тяжелое демиелинизирующее заболевание - острый или подострый центральный понтальный и/или экстрапонтальный миелолиз [3].

Особого внимания заслуживает ряд миелнокластических заболеваний, которые могут быть классифицированы как особые варианты рассеянного склероза. Начало рассеянного склероза клинически крайне сложно отличить от острого рассеянного энцефаломиелита (ОРЭМ) – аутоиммунного воспалительного заболевания ЦНС, развивающегося, как правило, после инфекций или вакцинаций. Дифференцировать от рассеянного склероза во многих случаях можно только на основе данных динамического наблюдения:

- при ОРЭМ процесс всегда однофазный, т.е. острый;
- при РС – хронический [3].

В большинстве случаев ОРЭМ развивается после инфекционного заболевания или вакцинации. Среди поствакцинальных энцефалитов

особенно часто описывают энцефалиты после введения вакцин против коклюша и оспы, а также после антирабических прививок.

ОРЭМ может развиваться после или во время:

- вирусных заболеваний (кори, краснухи, оспы, ветряной оспы, эпидемического паротита, инфекционного мононуклеоза, герпетической инфекции, гриппа);
- реже – при микоплазменной;
- другой бактериальной инфекции.

Патогенез заболевания основан на развитии аутоиммунной реакции и острого воспаления из-за перекрестных реакций между антигенами вирусов (реже бактерий) и антигенами мозга. В типичных случаях имеется латентный период в 4 – 6 дней. Заболевание начинается остро или подостро, с общеинфекционной, общемозговой и очаговой симптоматики, в тяжелых случаях - с судорожным синдромом и нарушением сознания. Часто ОРЭМ сочетается с острым полиневритом по типу моторного полиневрита Гийена - Барре [3].

Особый вариант рассеянного склероза был описан Девисом в 1894 г. и получил название оптикомиелит Девиса. Для этого заболевания характерны симптомы поражения спинного мозга (поперечный миелит) и зрительных нервов с одной или двух сторон, а также злокачественное неуклонно прогрессирующее течение и плохой прогноз. Наиболее часто случаи болезни Девиса встречаются у женщин коренных национальностей стран Юго-Восточной Азии. Патоморфологически очаги демиелинизации при этом заболевании близки к рассеянному склерозу, но иногда наблюдаются нетипичные для последнего диффузные воспалительные изменения с выраженным отеком ткани мозга и в редких случаях с геморрагиями. Данные МРТ и аутопсии свидетельствуют о возможности образования бляшек не только в спинном мозге и зрительных нервах, но и в перивентрикулярном белом веществе, редко в стволе мозга и мозжечке. В патогенезе

оптикомиелита Девиса большое значение имеют гуморальные аутоиммунные реакции с образованием антител к различным антигенам нервной ткани [3].

Концентрический склероз, или болезнь Балло, является неуклонно прогрессирующим демиелинизирующим заболеванием лиц молодого возраста. При этом заболевании образуются большие очаги демиелинизации преимущественно в белом веществе лобных долей, иногда с вовлечением серого вещества. Очаги состоят из чередующихся областей полной и частичной демиелинизации с выраженным ранним поражением олигодендроцитов. Зоны демиелинизации и ремиелинизации при этом расположены концентрически или хаотично; это придает очагам на томограммах характерный вид. До внедрения МРТ диагноз болезни Балло подтверждался только при аутопсии. Прогноз крайне неблагоприятен. В последние годы получены данные об улучшении в состоянии больных на фоне активной иммуносупрессии, что делает прогноз не столь фатальным, как ранее [3].

Лейкоэнцефалитом Шильдера чаще болеют дети, хотя нередко это заболевание начинается во взрослом возрасте. Для него характерна распространенная неуклонно прогрессирующая демиелинизация с образованием сливных зон воспаления и разрушения миелина. Типично распространение такой зоны демиелинизации с одного полушария на другое через мозолистое тело.

Некоторые авторы считают, что это заболевание является одним из злокачественных вариантов рассеянного склероза у лиц с особым набором факторов генетической предрасположенности [3].

Другим злокачественным вариантом рассеянного склероза является болезнь Марбурга, описанная как прогрессирующее заболевание с острым началом, преимущественным поражением ствола мозга, крайне злокачественным, с быстро прогрессирующим течением и быстрым смертельным исходом. Помимо ствола мозга, множественные очаги

демиелинизации при этом заболевании часто локализуются в зрительных нервах и шейном отделе спинного мозга. Патоморфологические очаги демиелинизации при болезни Марбурга характеризуются быстрым развитием дегенерации аксонов, иногда некрозом. Активная иммуносупрессия в ряде случаев способствовала наступлению ремиссии, что подтверждает общность болезни Марбурга и рассеянного склероза [6].

Следует отметить, что очаги демиелинизации в ЦНС довольно часто выявляются у больных с:

- системной красной волчанкой;
- первичным синдромом Шегрена;
- васкулитами различного генеза и другими системными аутоиммунными заболеваниями.

Разрушение миелина и развитие аутоиммунных реакций на его компоненты наблюдается при многих сосудистых и паранеопластических процессах в ЦНС, что следует учитывать при проведении дифференциального диагноза [6].

### **1.2.2 Купризоновая демиелинизация как модель рассеянного склероза**

#### *Поведение купризона в организме*

Принципиальный вклад в изучение патогенетических механизмов при аутоиммунных демиелинизирующих заболеваниях внесло моделирование этих процессов на животных. Интоксикация купризоном представляет собой превосходную модель для изучения патологий и терапии заболеваний человека, таких как рассеянный склероз, эпилепсия и шизофрения.

Медь является кофактором многих медь содержащих ферментов (супероксиддисмутаза, цитохромоксидаза и т.д.), играющих важную роль в клеточных процессах и, следовательно, имеет жесткую регуляцию внутри

клетки. Нарушение медного гомеостаза может привести к нейродегенерации. Таким образом можно предположить, что формирование купризон-индуцированной патологии происходит за счет затягивания меди в клетку или ее недостатка при хелатировании. На сегодняшний день были исследованы обе гипотезы, касающиеся физико-химического поведения купризона [59].

Первая гипотеза предполагает, что купризон-индуцированная патология формируется от недостатка меди. Авторы этой гипотезы предполагают, что купризон вызывает функциональный дефицит меди поскольку они не смогли обнаружить купризон в экстракте мозга и печени или образцах сыворотки крови, а также комплексы  $\text{Cu}^{2+}$  и купризона в ЖКТ [17].

Вторая гипотеза утверждает, что медь в хелатированной форме трехвалентна и требует 2 молекулы купризона на один атом меди для образования комплекса. Было предположено, что купризон должен присутствовать в головном мозге, поскольку при 9 месячном введении купризона было обнаружено 5 кратное увеличение его содержания в мозге за счет комплексов купризона с медью и гидразиновой группы купризона частично гидролизованной при образовании комплексов. Образование гидразина (гидразин высокотоксичен) приводит к ингибированию ферментов [50].

#### *Изменение внутриклеточных процессов*

В то время как формирование мегамитохондрий в печени можно наблюдать только при 0,5% купризоновой диете, в олигодендроцитах формирование мегамитохондрий наблюдается при 0,2% диете уже на третью неделю. Однако в других типах клеток (нейроны, астроциты, кардиоциты, жировые клетки) формирование мегамитохондрий не наблюдается вообще [15].

Последние исследования *in vitro*, в которых культура первичных глиальных клеток подвергалась воздействию купризона, показали, что астроциты и предшественники олигодендроцитов не затрагиваются купризоном, в то время как зрелые олигодендроциты проявляют признаки токсического повреждения (например, снижением митохондриального потенциала и выживаемости). Было показано, что ингибирование процесса деления служит основным механизмом при формировании мегамитохондрий. Однако митохондрии быстро восстанавливают нормальную морфологию, когда воздействие купризона прекращается. *In vitro* митохондрии менее подвержены воздействию активных форм кислорода и азота, что приводит к формированию мегамитохондрий. Таким образом, мегамитохондрии можно рассматривать как защитный механизм при оксидативном стрессе. Тем не менее количество активных форм кислорода все равно резко возрастает за счет выпадения электронов из ЭТЦ вследствие обрыва окислительно-восстановительного фосфорилирования [62].

Образование мегамитохондрий, нехватка АТФ и возрастающие концентрации активных форм кислорода и азота приводят к нарушению нормальной работы эндоплазматического ретикулума. Стресс эндоплазматического ретикулума характеризуется увеличением ретикулума и снижением синтеза гидрофобных белков [39].

Также происходит снижение транскрипции и трансляции мРНК для предотвращения возникновения дефектных белков. Таким образом, подавление синтеза белков, связанных с миелином, можно наблюдать уже на первой неделе купризоновой диеты и вплоть до прекращения введения купризона. Тем не менее, белки с неправильной конформацией продолжают накапливаться и в конечном счете вызывают реакцию развернутого белка (UPR), что приводит к высвобождению кальция в цитозоль и гибели олигодендроцитов.

Синтез белка и правильное функционирование эндоплазматического ретикулума зависит от наличия аминокислот в плазме крови, что, в свою очередь, может зависеть от функционирования гепатоцитов. Поскольку интоксикация купризоном нарушает функционирование печени, то нет ничего удивительного в том, что уровень содержания аминокислот в плазме крови меняется. Таким образом, снижение уровня аланина, пролина и глицина в плазме крови приводит к отклику аминокислотного пути (amino acid response pathway). Активация этого пути приводит к фосфорилированию эукариотического фактора инициации (eIF-2 $\alpha$ ), который может управлять как про- так и противоапоптотической экспрессией генов, что приводит к угнетению трансляции мРНК и синтеза белка [36].

Кроме того, метаболизм миелина зависит от липидов. Большая часть миелиновой оболочки (70%) состоит из липидов, треть из которых фосфолипиды обеспечивающие структурную поддержку и антиоксидантные функции. Мембраносвязанные фосфолипиды могут быть гидролизованы плазмалогеназой, что приведет к увеличению свободных фосфолипидов. Фосфолипаза–А2 способна проводить деградацию как мембраносвязанных, так и свободных фосфолипидов до арахидоновой кислоты, которая является ключевым провоспалительным сигнализатором. Плазмалогеназа и фосфолипаза–А2 увеличивают свою активность при интоксикации купризоном. Производимая арахидоновая кислота затем метаболизируется циклооксигеназами 1 и 2 до простагландина H<sub>2</sub>, который в свою очередь может привести к увеличению простагландина E<sub>2</sub>, простациклина, и тромбоксана 2 [16].

#### *Клеточные изменения*

Стресс ЭПР и окислительный стресс приводят к вырождению перикариона и миелиновой оболочки, вызывая заметный апоптоз олигодендроцитов уже через несколько дней после начала интоксикации. Однако массовый апоптоз олигодендроцитов происходит на четвертую

неделю воздействия с участием иммунной системы, обеспечивающей вторичный удар. Интересно, что к 6 недели клетки предшественники олигодендроцитов дифференцируются во взрослые клетки. Замечено, что трехнедельного воздействия купризона достаточно, чтобы вызвать глубокую демиелинизацию [30].

Несмотря на то, что патологии нейронов считаются редкими при демиелинизации, литературные источники указывают на обратное. Ранние изменения заметны на уровне синапса где концентрации медиатора нарушена вследствие нарушения деятельности синтезирующих ферментов. Кроме того, в демиелинизированных участках аксона можно наблюдать торможение активности транспортных белков, что в конечном итоге приведет к потере аксона.

У молодых мышей линии C57BL/6 не происходит никакой потери клеток, однако с возрастом потеря нейронов может достигать до 50%. Удивительно то, что большинство нейронов выживают в острой купризовой интоксикации, несмотря на то, что они в равной или зачастую большей степени уязвимы к метаболическим возмущениям по сравнению с олигодендроцитами. Возможным объяснением является метаболическая связь нейронов с астроцитами, которые защищают их от окислительного стресса. Хорошо описано, что при окислительном стрессе астроциты могут запускать процесс гликолиза, тем самым создавая буфер, защищающий нейроны от окислительного стресса [29].

Поскольку нейроны не могут синтезировать ГАМК и глутамат, между ними и астроцитами между ними существует глутамино – глутамат – гамма-аминомасляный цикл. Как и другие гидразин-содержащие вещества купризон ингибирует глутаминдекарбоксилазу, что приводит к нехватке энергии, повышению концентрации глутамата и снижению ГАМК. Изменение концентрации глутамата может быть ответственно за повышение активности

глутамат–аспартатных транспортеров во время демиелинизации, как попытка астроцитов сохранить концентрацию глутамата на нетоксичном уровне [18].

Помимо этого, затрагиваются дофамин и норадреналинергические синапсы. Дофамингидроксилаза – медьсодержащий фермент, катализирующий образование норадреналина из дофамина, имеет сниженную активность в течение интоксикации купризоном, что приводит к увеличению дофамина и снижению норадреналина в префронтальной коре в первые две недели интоксикации. Кроме того, моноаминоксидаза, необходимая для удаления дофамина, также ингибируется.

Внеклеточные глутамат и дофамин могут поглощаться олигодендроцитами а затем самоокисляются, что также приведет к снижению антиоксидантной защиты. Высокая концентрация железа в олигодендроцитах стимулирует этот процесс автоокисления, продуцируя активные формы кислорода и перекись водорода. Кроме того, поглощение избыточных медиаторов олигодендроцитами может усилить активность глутаматных рецепторов, таких как AMPA- и КА-рецепторы которые могут привести к набуханию и цитотоксической гибели клеток. Кроме того, NMDA рецепторы были обнаружены на миелиновых оболочках, что может вызывать поступление ионов натрия и кальция с последующим отеком и вакуолизацией миелиновой оболочки.

В то время как краткосрочная интоксикация вызывает нарушение концентрации нейромедиаторов, в долгосрочной перспективе купризон дополнительно приводит к потере аксонов. Из-за митохондриальных нарушений вследствие чего снижается количество АТФ, и Na/K АТФаза не может реполяризовать перехваты Ранвье после проведения импульса по аксону. Это в сочетании с демиелинизацией приводит к повышению концентрации ионов Na и Ca внутри аксона, что приведет к его повреждению.

Несмотря на то, что недавно было показано, что после введения купризона апоптоз олигодендроцитов происходит уже в течение нескольких дней, продолжают накапливаться данные о том, что на четвертую неделю интоксикации происходит дополнительное воздействие на олигодендроциты от иммунной системы. *In vitro* при интоксикации купризоном страдают синтез белка миелина и митохондрии, что в конечном итоге приводит к вакуолизации миелиновой оболочки, но апоптоза олигодендроцитов не происходит. Однако, когда клеточные культуры обрабатывали купризоном в сочетании с фактором некроза опухолей (TNF $\alpha$ ) и интерфероном гамма (INF $\gamma$ ) происходило снижение активности ферментов электронтранспортной цепи митохондрий и увеличение выработки активных форм кислорода, а также индуцирование апоптоза олигодендроцитов. *In vivo* ингибирование пролиферации микроглии (микроглиоза) путем введения миноциклина значительно снижает гибель олигодендроцитов. Таким образом, имеющиеся данные указывают на участие иммунной системы в апоптозе олигодендроцитов. [36].

Много гипертрофированных астроцитов появляется в местах накопления внеклеточной жидкости, являющейся продуктом распада внутриклеточных и внутримиелиновых вакуолей. Эти астроциты характеризуются многочисленными цитоплазматическими вакуолями и широким присутствием глиальных волокон. Все это сопровождается разбуханием астроцитов, они выглядят водянистыми, бледными и лишены органелл, все эти признаки свидетельствуют о попытке восстановить гомеостаз. Увеличение ферментативной активности астроцитов можно заметить уже через неделю после введения купризона, показана повышенная активность глутаматдегидрогеназы, диафороазы, лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, комплекса II в электронтранспортной цепи, металлотioneина-1, металлотioneина-2 и глутатион-S-трансферазы. Активация астроцитов, в конечном итоге, может

привести к обширному астроглиозу (увеличение численности астроцитов) в мозолистом теле к четвертой неделе интоксикации купризоном. Астроциты могут активироваться после практически любого нарушения мозгового гомеостаза в связи с разнообразием клеточных рецепторов. Активированные астроциты способны защитить окружающие клетки от истощения АТФ, окислительного стресса и кальциевой перегрузки. Кроме того, астроциты поддерживают ионный гомеостаз ЦНС, очищая от избыточных нейромедиаторов и секретирующихся нейротрофических факторов, способствуя выживанию клеток и ремиелинизации [48].

Что касается последнего, экспрессия периферического бензодиазепинового рецептора (PBR, также известного как TSPO) приводит к поглощению митохондриями холестерина, прекурсора для синтеза стероидов. Экспрессия PBR достигает своего пика на четвертую неделю введения купризона и постепенно исчезает после прекращения купризона интоксикации. Во время ремиелинизации PBR экспрессируется только в астроцитах, в то время как экспрессия PBR в микроглии быстро прекращается. Была обнаружена корреляция между экспрессией PBR и синтезом стероидных гормонов и ремиелинизацией. Полагают, что астроциты обеспечивают трофическую поддержку во время ремиелинизации. Это предположение подкрепляется тем фактом, что внутрибрюшинное введение небольшого количества холестеринподобных соединений ведет к ускорению ремиелинизации, а введение прогестерона снижает демиелинизацию и проявление поведенческих нарушений.

Еще одним фактом, подтверждающим нейропротекторную функцию астроцитов является увеличение экспрессии ретин-альдегид-дегидрогеназы, участвующей в синтезе ретиноевой кислоты. Ретиноевая кислота связывается с ядерными рецепторами (retinoid X receptor–RXR), контролирующими экспрессию противовоспалительных генов [45].

В исследовании Hiremath et al. (1998) при интоксикации купризоном был описан обширный микроглиоз (увеличение микроглии). Микроглиоз был замечен на второй неделе и достиг своего пика на четвертую неделю, что совпало с тотальной демиелинизацией и началом ремиелинизации. На пике микроглиоза наблюдается большое количество пролиферирующей микроглии, хотя около 30% клеток микроглии происходят от периферических клеток предшественников, принявших фенотип микроглии после инфильтрации. Проникновение периферических макрофагов зависит от сигнальной цепи хемокинов (CCR2/CCL2). Однако микроглия и макрофаги фенотипически являются одинаковыми и в литературе редко делают различия между двумя популяциями клеток. При купризоновой интоксикации было описано 2 фенотипа микроглии: провоспалительный M1 и противовоспалительный или регенеративный M2. Важно отметить, что частицы миелина имеют регулирующий эффект на микроглию при активации фагоцитоза, что сказывается на процессе ремиелинизации, как было показано, микроглия меняет фенотип на противовоспалительный (M2) в течение фагоцитоза миелина. Таким образом, микроглия наблюдается в участках вакуолизации миелина, где она фагоцитирует избыток жидкости и частицы миелина. Однако некоторые авторы сообщали о том, что микроглия может активно участвовать в зачистке аксонов от миелина. Этот процесс может быть обусловлен усилением активности фактора транскрипции P8, в результате чего усиливается экспрессия матриксных металлопротеиназ (ММП). Матриксные металлопротеиназы, как известно, стимулируют разрушение оболочки миелина. Кроме того, интоксикация купризоном может нарушать баланс между тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMPs) и металлопротеиназами.

Нарушение ГЭБ является одним из признаков рассеянного склероза, так как это способствует проникновению аутореактивных клеток в ЦНС. Однако в купризоновой модели ГЭБ остается нетронутым. При интоксикации

купризоном только 1,5% периферических лимфоцитов проникала через ГЭБ, кроме того проникающие клетки не активированы. Однако интоксикация купризоном может приводить к появлению миелинспецифичных Т- и В-лимфоцитов [49].

### **1.2.3 Нейродегенерация при рассеянном склерозе**

Рассеянный склероз является самой частой болезнью центральной нервной системы людей молодого возраста, и число заболевших им увеличивается. Это является одной из причин, по которым РС привлекает внимание исследователей практически во всех областях нейронаук. В последние 10-15 лет в нашем понимании сущности РС и подходах к его лечению произошли значительные перемены. Прежде всего, оказалось, что это заболевание является не только воспалительным по своей природе, как это считалось многие годы, но и нейродегенеративным. Каждый из этих двух компонентов патогенеза имеет свои клинические и параклинические проявления. Воспаление при РС проявляется острым началом заболевания (или его эксацербации), наличием обострений, морфологией очагов демиелинизации с наличием Т-лимфоцитов и макрофагов, накоплением контраста в очагах при проведении МРТ в режиме T1 и ответом на кортикостероидную и иммуномодулирующую терапию. Подтверждением наличия нейродегенеративного компонента является постепенное прогрессирование заболевания; наличие стабильных «чёрных дыр» на МРТ; морфологически доказанные гибель аксонов, апоптоз олигодендроцитов и нейронов не только в очагах демиелинизации, но и в «нормально выглядящем» белом и сером веществе, что подтверждается снижением уровня N-ацетиласпартата (NAA), выявляемого при МР-спектроскопии (MRS); нарастающая атрофия головного и спинного мозга и развитие когнитивных нарушений [10].

Однако РС выгодно отличается от таких классических нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. При них клиническая манифестация происходит на этапе, когда значительная часть аксонов уже погибла. При РС первые симптомы появляются тогда, когда повреждение аксонов ещё не столь выражено, что позволяет начать патогенетическую терапию на ранней стадии заболевания.

В настоящее время принята двухфазная модель патогенеза РС. В первой фазе значительно преобладают процессы воспаления с частыми обострениями и ремиссиями и появлением множества очагов на МРТ. Показано, что уже на этом этапе и даже в самой дебютной его фазе – на стадии клинически изолированного синдрома – имеется аксональное повреждение, что отражается в снижении уровня НАА. Однако оно выражено незначительно и частично обратимо. Во второй же фазе превалируют нейродегенеративные процессы, проявляющиеся в неуклонном прогрессировании неврологических расстройств, отсутствии (или снижении) активности процесса по данным МРТ, нарастающей атрофии головного и спинного мозга. Гистологическое исследование ткани мозга обнаруживает наличие терминальных аксональных овоидов и нефосфорилированных нейрофиламентов. Однако эта двухфазная модель менее применима к первично-прогрессирующему РС, когда нейродегенеративные процессы становятся очевидными с ранних стадий заболевания [10].

Если механизмы демиелинизации достаточно хорошо изучены, то патогенез аксональной гибели менее понятен. Предполагаются несколько факторов, ответственных за повреждение аксонов: прямая иммунная атака демиелинизированных аксонов воспалительными клетками и антителами; «отсроченная травма» аксонов при нахождении их в воспалительной среде; отсутствие трофической поддержки миелина; не исключается также и возможность первичной аксональной дегенерации, приводящей к вторичному воспалительному ответу. Гибель аксонов (а затем и нейронов) в

сочетании с демиелинизацией приводит к развитию атрофии головного (в том числе и коры) и спинного мозга [10].

Связаны ли между собой воспалительные и нейродегенеративные изменения при РС? Существует несколько гипотез. Согласно одной из них, воспаление первично и именно воспалительные процессы в ЦНС приводят к нейродегенерации. По другой – воспаление и нейродегенерация при РС существуют независимо друг от друга. И наконец имеется гипотеза, что первична нейродегенерация с апоптозом миелинообразующих клеток - олигодендроцитов, а воспалительная реакция в мозге вторична. Не исключено, что все эти варианты патогенеза действительно имеют место при различных типах течения РС. Наиболее обоснованной представляется гипотеза о том, что воспаление и нейродегенерация лишь частично взаимосвязаны – на ранних этапах развития ремитирующего РС повреждение аксонов является прямым следствием воспалительной аутоиммунной атаки, а при вторично- и первично-прогрессирующем РС нейродегенеративные процессы развиваются независимо от воспаления. Существует мнение, что в этих случаях развитие нейродегенерации схоже с постполио-синдромом, когда клетки, «выжившие» после вирусной инфекции, через многие годы подвергаются апоптозу. Таким образом, при РС повреждённые воспалительным процессом клетки могут погибать через несколько лет без развития воспаления. И всё же в многочисленных работах показано, что высокая частота обострений (проявление воспаления) приводит к быстрому развитию необратимого неврологического дефицита (проявление нейродегенерации) [10].

### 1.2.4 Нейрогенез при демиелинизации

За последнее десятилетие приоритетные направления научных исследований патогенетических механизмов рассеянного склероза (РС) претерпели значительные изменения. Если еще около 10 лет назад «аксональная гипотеза» и «нейродегенеративный компонент» патогенеза РС формулировались в виде предположения, то в настоящее время они обсуждаются как общепризнанные феномены наряду с нарушениями проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), мультифокальным воспалением, демиелинизацией, гибелью олигодендроцитов и реактивным глиозом. При этом именно дегенеративное повреждение рассматривается как основная причина нарастания необратимого неврологического дефицита и прогрессирования инвалидизации при данном заболевании.

В то же время в последние годы внимание исследователей фокусируется не только на механизмах повреждения мозговой ткани при РС, но и на адаптивных процессах, которые направлены на замедление нейродегенерации. Компенсаторные реакции могут активироваться спонтанно или модулироваться под влиянием терапевтических воздействий. Применительно к РС компенсаторные процессы могут развиваться на разных уровнях: на клеточном за счет активации ранее существовавших связей (аксональный спрутинг, изменения синаптической стабильности или реорганизация синапсов), на тканевом (ресорбция отека, перестройка натриевых каналов вдоль аксональной мембраны и ремиелинизация), на системном (например, изменения возбудимости первичной и вторичной моторных зон в ипси- и контралатеральном полушарии) и, наконец, на поведенческом уровне за счет разработки и тренировки новых двигательных и когнитивных стратегий [42].

Несмотря на аксональную гибель в активных очагах РС, состояния обострения болезни обратимы. Выделяются, по меньшей мере, два

механизма восстановления функций на ранних этапах болезни: редундантность (избыточность) ЦНС и значительные возможности компенсации нейрональной гибели [22].

В связи с избыточностью волокон в центральных проводящих путях для развития соответствующих клинических проявлений необходимо, по-видимому, повреждение большего количества волокон. Если по аналогии с болезнью Паркинсона считать, что потеря 60-70% нейронов или аксонов вызывает необратимый неврологический дефицит, то, безусловно, маловероятно, что данный порог будет достигнут лишь за счет острых очагов демиелинизации. Потеря аксонов не оказывает заметного влияния на ранних этапах ремиттирующего РС, однако конверсия ремиттирующего во вторично-прогрессирующее течение происходит именно при истощении возможностей компенсации дальнейшей аксональной гибели [31].

Образование нового очага демиелинизации сопровождается нарушением проницаемости ГЭБ, лейкоцитарной инфильтрацией, демиелинизацией и гибелью олигодендроцитов. Именно отек, окружающий очаг демиелинизации, является основной составляющей обострения, при котором развивается блок проведения потенциала действия. В качестве другой причины нестойкой, обратимой инвалидизации рассматривается демиелинизация [31].

На данном этапе уменьшение выраженности воспалительных реакций с удалением продуктов воспалительных реакций является основной базой регресса неврологического дефицита [22].

Завершение воспалительной фазы способствует активации ремиелинизации, для развития которой требуется несколько недель, а также стимулирует секрецию нейротрофических факторов, имеющих важное значение для функционирования нервной системы.

Обсуждая иммунопатологические реакции при РС, необходимо учитывать и парадоксальные защитные свойства аутоиммунитета. *In vivo*

показано нейропротективное влияние определенных миелин-аутореактивных Т-клеток: защита нейрона от вторичной дегенерации после частичного повреждения зрительного нерва на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) [51].

При этом в целом ряде исследований была установлена способность активированных антиген-специфичных Т-клеток и других клеток иммунной системы продуцировать биоактивные нейротрофические факторы. Так, экспрессия BDNF (нейротрофического фактора мозгового происхождения) была отмечена при РС в инфильтрирующих иммунных клетках, особенно Т-лимфоцитах и макрофагах, а также в нейронах и реактивных астроцитах [40].

При этом большое число иммунных клеток экспрессирует BDNF именно в зонах активной демиелинизации в очагах РС. Кроме этого, BDNF может антероградно транспортироваться и выделяться нейронами, что особенно усиливается после аксонального повреждения и трансекции. Выявление подобного феномена предполагает, что нейрональный BDNF также может обеспечивать эндогенную нейротрофическую поддержку в очагах РС. Важной чертой эндогенной экспрессии нейротрофинов в очагах РС является их присутствие по краям активной демиелинизации, что подчеркивает возможность существования «пенумбры» субтотального повреждения вокруг бляшки РС. Баланс между деструктивными и протективными факторами в этой зоне имеет важное значение [41].

Меньшее количество эндогенных нейротрофинов выявляется в хронических очагах РС, что может являться одной из причин текущей аксональной дегенерации на этапе хронической, прогрессирующей фазы болезни.

В качестве других эндогенных протективных медиаторов при экспериментальном воспалении рассматриваются CNTF (цилиарный нейротрофический фактор) и LIF (лейкемия-ингибирующий фактор). Нарушение сигнальных путей этих факторов у мышей с соответствующими

мутациями на модели ЭАЭ приводило к гибели олигодендроцитов и, соответственно, усиливало тяжесть болезни [19].

Также обсуждается роль фактора роста нервов (NGF), который может влиять на функцию В- и Т-клеток, миграцию макрофагов в очаги воспаления и, как было показано на экспериментальных моделях, обладает противовоспалительным действием и уменьшает тяжесть ЭАЭ [12].

Таким образом, нейропротективные эффекты иммунных клеток, которые, по меньшей мере, частично могут быть опосредованы за счет продукции и секреции нейротрофических факторов, позволили сформулировать положение о нейропротективном аутоиммунитете, что служит основой для обсуждения новых терапевтических стратегий [28].

Другой возможный ключевой фактор восстановления функции ЦНС – нейропластичность, которая активируется в ответ на острое повреждение (это было подтверждено при использовании метода функциональной МРТ (фМРТ)).

Изменения, наблюдаемые в мозге непосредственно после острого повреждения, включают снижение/выпадение функции пораженной зоны; дишиз или изменения работы зон, функционально связанных с пострадавшей зоной; изменения возбудимости гомологичных коллатеральных областей.

В последующем, параллельно с локальной реорганизацией поврежденной ткани, наблюдается реактивация прилегающих регионов для замещения поврежденных клеток и начинаются рекрутмент функционально взаимосвязанных сетей и формирование новых связей [22].

При РС корковая реорганизация наиболее изучена при использовании тестов на двигательные функции. Важно подчеркнуть, что изменения функциональной активации коры наблюдаются даже при отсутствии у пациентов двигательного дефицита.

В то же время сопоставление локализации зон корковой активации при различных фенотипах РС позволяет сформулировать гипотезу о динамических изменениях корковой активности по мере прогрессирования болезни от ремиттирующего течения к вторичному прогрессированию с вовлечением не только первичной и дополнительной моторных зон, но и более широкой активацией коры. При этом если на начальном этапе более типичным являются рекрутмент и увеличение размеров зон, обычно участвующих в двигательной функции, то на более поздних этапах чаще наблюдаются билатеральная активация и вовлечение областей, в норме активирующихся при выполнении новых или комплексных задач [58].

Усиление активации большой сети корковых и подкорковых зон, ассоциированных с движением, отмечено и в мультицентровом функциональном исследовании РС при использовании двигательного задания для руки при отсутствии в ней клинически значимых нарушений [67].

Кроме этого, при РС при выполнении простого задания помимо изменения локализации зон корковой активации модифицируются и связи между ними: наблюдается как усиление, так и уменьшение взаимосвязанности активации сенсомоторных сетей, при этом усиление этих взаимосвязей рассматривается в качестве компенсаторного механизма [57].

Проведенные исследования свидетельствуют о корреляции между функциональной корковой реорганизацией и степенью повреждения ЦНС [34]. При этом имеет значение не только очаговое демиелинизирующее поражение, но и патология внешне неизмененного белого вещества, а также гибель аксонов, что особенно актуально при вторичном прогрессировании. Необходимо также учитывать и изменения в спинном мозге, которые, вероятно, могут как индуцировать корковые изменения, так и ограничивать адаптивные возможности.

Другим общепризнанным компенсаторным феноменом при РС является изменение характера проведения импульса за счет

перераспределения вольтаж-зависимых  $\text{Na}^+$ -каналов вдоль демиелинизированного волокна, ремоделирования аксолеммы [32].

Так, в экспериментальных исследованиях в демиелинизированных сегментах была показана смена сальтаторного характера проведения на постоянное, характерное для немиелинизированных волокон, или микросальтаторное, что обеспечивается образованием вдоль демиелинизированной аксолеммы каждые 100-400 мкм (в среднем 255 мкм) фокусов  $\text{Na}^+$ -каналов, подобных перехватам Ранвье и названных  $\text{phi}$ -узелками [35]. При этом предполагается, что повышение плотности  $\text{Na}^+$ -каналов в мембране демиелинизированных волокон может быть обусловлено включением новых  $\text{Na}^+$ -каналов, в качестве источника которых рассматриваются как тело нейрона, так и глиальные клетки [37]. Обсуждается также возможность секреции астроцитами экстрацеллюлярных молекул, которые участвуют в образовании  $\text{Na}^+$ -каналов в местах агрегации [66], что может облегчать контакты отростков астроцитов с участками аксональной мембраны в области перехватов Ранвье с высокой плотностью натриевых каналов. Возможно также, что даже небольшая плотность натриевых каналов обеспечивает проведение потенциала действия по аксонам малого диаметра [65], т.е. несмотря на то, что плотность натриевых каналов в интернодальной зоне значительно меньше, чем в области перехватов Ранвье, этого может быть достаточно для восстановления проведения импульса в условиях уменьшения диаметра аксона, развивающегося вторично на фоне повреждения миелиновой оболочки.

При изучении различных изоформ натриевых каналов показано увеличение экспрессии Nav1.2 и Nav1.6 вдоль демиелинизированных аксонов ЦНС [20]. Увеличение экспрессии Nav1.6, а также коэкспрессия Nav1.6 и  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -переносчика сопровождаются постоянным поступлением ионов  $\text{Na}^+$  в аксон через неинактивированные Nav1.6-каналы, что превышает возможности АТФ-зависимой  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы по удалению натрия (на фоне

сниженного ее количества) и активирует работу  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -переносчика в обратном режиме с удалением  $\text{Na}^+$  и импортированием повреждающего уровня  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь аксона. Увеличение внутриклеточного кальция активирует различные патологические каскады, что приводит к аксональной дегенерации [64].

Противоположное значение имеет перераспределение Nav1.2-каналов: интенсивное их распространение вдоль демиелинизированных, но неповрежденных аксонов при ЭАЭ и в активных очагах РС, аналогичное диффузному паттерну их расположения вдоль немиелинизированных аксонов ЦНС, позволяет предположить их участие в поддержании проведения потенциала действия [64]. Данная изоформа натриевых каналов характеризуется меньшей инактивацией при умеренной деполяризации и меньшей возможностью открываться и проводить потенциал действия на высокой частоте импульса по сравнению с Nav1.6-каналами [60]. Это предполагает, что Nav1.2-каналы могут поддерживать проведение вдоль демиелинизированных аксонов даже при деполяризации, которая наблюдается в волокнах в результате повреждения, но проведение в этих аксонах ограничено низкочастотными импульсами. Так как Nav1.2-каналы вызывают меньший по сравнению с Nav1.6 постоянный ток ионов натрия, можно предположить, что экспрессия Nav1.2-каналов демиелинизированными аксонами является фактором, способствующим их выживанию.

Другим защитным механизмом может являться неспособность демиелинизированных аксонов проводить импульсные последовательности очень высокой частоты, а также передавать среднечастотные серии импульсов в течение длительного времени, что также предотвращает чрезмерное поступление натрия в аксон [61].

Еще одним восстановительным механизмом при РС является ремиелинизация, которая может наблюдаться в некоторых очагах [53], что,

по экспериментальным данным, сопровождается восстановлением проведения в демиелинизированных аксонах как центральной, так и периферической нервной системы [33]. В качестве клеток, способствующих ремиелинизации, рассматриваются клетки – предшественники олигодендроцитов [56]. При этом выраженность ремиелинизации варьирует в разных случаях.

Следует, однако, отметить, что ремиелинизация при РС наблюдается локально, характеризуясь образованием тонкого миелина с короткими интернодальными промежутками. Даже при развитии ремиелинизации при РС этот процесс может носить временный характер, поскольку в этих же очагах может вновь наблюдаться демиелинизация – характерный признак болезни [54]. Подобное повторяющееся демиелинизирующее поражение одной и той же зоны белого вещества ЦНС рассматривается как один из факторов, обуславливающих невозможность реализации ремиелинизации при РС.

В качестве других причин недостаточной ремиелинизации при РС рассматриваются: 1) количественное уменьшение клеток – предшественников олигодендроцитов, а также невозможность этих клеток дифференцироваться в миелинообразующие олигодендроциты; 2) неспособность данных клеток «отвечать» на демиелинизацию; 3) селективное истощение с течением времени миелинообразующих клеток вокруг зон демиелинизации; 4) угнетение ремиелинизации в результате дисбаланса между провоспалительными и про-ремиелинизирующими эффектами цитокинов; 5) ограничение эндогенной миграции клеток – предшественников олигодендроцитов к месту повреждения за счет реактивного астроглиоза; 6) острую и/или хроническую потерю аксонов [52].

Возможности участия нейрогенеза в процессах восстановления функций при РС дискутабельны. Базовые механизмы восстановления функций включают усиление арборизации дендритов (ветвления), спрутинг

сохранившихся аксонов, синаптогенез, активацию и потенциацию функционально «немых» синаптических связей. В хронических очагах РС описано повышение синаптической плотности клеток, фенотипически похожих на незрелые нейроны, что позволило авторам предполагать возможность нейрогенеза в субпопуляции подкорковых очагов демиелинизации [26], который может рассматриваться в качестве нейрональной компенсации. Возможность нейрогенеза в воспалительных очагах в спинном мозге показана и на модели ЭАЭ [27].

При РС обсуждаются и изменения функционирования синапса, синаптическая пластичность. По мнению ряда авторов, под влиянием увеличения экстрацеллюлярной концентрации глутамата в сером веществе могут инициироваться два варианта изменений в синапсе: долгосрочное потенцирование и долгосрочная депрессия, что может отражаться на синаптических взаимосвязях в поврежденной зоне [69].

Рассматривается и возможность регенерации поврежденных аксонов. По определению аксональная регенерация может включать следующее: 1) поврежденные аксоны формируют новые отростки непосредственно в месте пересечения; 2) распространяются за очаг для достижения денервированной зоны; 3) интегрируются в функциональные нейрональные схемы [70].

На экспериментальной модели РС показано remodelирование аксонов на многих уровнях при наличии одного воспалительного очага на среднегрудном уровне спинного мозга: 1) вокруг очага отмечается регенеративный спрутинг локальных интернейронов; 2) выше очага аксоны кортико-спинального тракта образуют новые коллатерали с формированием обходных путей к поясничной области, в то время как ниже очага у сохранных аксонов тракта увеличивается ветвление терминалей; 3) в моторной коре наблюдается рекрутмент новых нейронов в корковый моторный пул [41].

Однако ограничивающим регенерацию препятствием является наличие в ЦНС угнетающих рост факторов. Так, было показано, что некоторые компоненты центрального миелина (миелин-ассоциированные белки) препятствуют росту аксонов [21]. В частности, антитела против одного из них, Nogo-A, блокируют ингибиторную активность *in vitro* и способствуют аксональной регенерации *in vivo*. Nogo-A - трансмембранный протеин, экспрессирующийся преимущественно на поверхности олигодендроцитов и в некоторых субпопуляциях центральных нейронов. Два региона Nogo-A ответственны за ингибиторный эффект: один регион N-терминали и второй регион (66 аминокислот) C-терминали, названный Nogo-66. Последний связывается с Nogo-рецептором (NgR) (выявляется селективно только на нейронах и присутствует на всем аксоне), который также является рецептором для миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG) и олигодендроцит-миелинового гликопротеина (OMgp) [63]. В дальнейшем были идентифицированы и другие молекулы, обладающие свойством ограничивать рост нейритов. Эта группа центральных ростковых ингибиторов включает эфрины, семафорины, протеогликаны, белки миелина, в частности миелин-ассоциированный гликопротеин и олигодендроцит-миелиновый гликопротеин.

На экспериментальной модели было также показано, что после селективного пересечения волокон кортикоспинального тракта на среднегрудном уровне терапевтическое введение антител против ингибиторного протеина Nogo-A способствует более быстрому и полному восстановлению двигательных функций [47]. Количественная оценка регенеративного спрутинга рострального места повреждения и регенерация волокон кортико-спинального тракта каудальнее места повреждения выявила значительное улучшение параметров в терапевтической группе по сравнению с контролем. При этом отдаленная регенерация поврежденных аксонов отмечена только после Nogo-нейтрализации [70].

Также после двустороннего пересечения кортико – спинального тракта в присутствии Nogo-A нейтрализующих антител было показано увеличение коллатералей руброспинального тракта, иннервирующих шейный отдел спинного мозга, что коррелировало с клиническим улучшением [55]. Приведенные данные демонстрируют, что параллельные, анатомически обособленные системы могут компенсировать, по меньшей мере частично, повреждение другой системы [70].

Согласно экспериментальным данным, деактивация Nogo-A способствует функциональному восстановлению при ЭАЭ [68]. В связи с этим блокада взаимодействия Nogo-A с соответствующим рецептором (NgR1), использование Nogo-A-нейтрализующих антител рассматривается как возможная терапевтическая мишень при РС.

### **1.2.5 Полипrenoлы в качестве возможного модулятора нейрогенеза при демиелинизации**

В последние годы во всём мире резко увеличивается количество исследований патологии долихолфосфатного цикла (ДФЦ). Также увеличивается количество исследований веществ, связанных с этим циклом – долихолы (ДХ) и полипrenoлы (ПП).

Исследованиями последних десятилетий показано, что в случаях гипертонии, энцефалита, рассеянного склероза, инсульта и других патологий нарушено нормальное функционирование долихолфосфатного цикла (ДФЦ) на уровне мембран клетки, повышается вывод долихоллов (ДХ) из организма и наблюдается дефицит долихоллов. ДФЦ играет главную роль в процессе синтеза гликопротеинов и гликоаминогликанов. Процесс гликолизации мембранных белков является очень важным для нормального функционирования клетки, так как это предотвращает протеолиз белков в

процессе синтеза, а также помогает определить локус тех мембран, в которых образуются белки. В мембранах происходит гликолиз примерно 10% всех белков и 5-26% липидов [1].

Ведущую роль вДФЦ играют (ДХ) с помощью которых происходит соединение глюкоаминоглюканов и гликопротеинов. ДХ относятся к группе полиизопренов. Синтез ДХ в организме животных и человека происходит в печени, наподобие пути образования холестерина. При попадании в организм через пищеварительный тракт растительные полипренолы (ПП) метаболизируются в ДХ и обеспечивают нормальную работу ДФЦ. Количество ДХ в разных тканях животных и человека сильно отличается. Структуральное сходство ДХ и ПП позволяет обосновывать возможность применения полипренолов для профилактики различных паталогий и для стабилизации действия ДФЦ и, возможно, для лечения определенных заболеваний [46].

Источником ПП в природе является хвоя хвойных деревьев (сосна, ель, пихта, гинко), содержащая 0,5-1,5% ПП от сухой массы хвои. Длина цепочки углеродных атомов молекул ПП для хвойных составляет С55-С110, что близко к длине ДХ в организме животных и человека. Фармакотерапевтическое действие ПП исследовано на базе моделей нескольких патологий: рассеянный склероз, панкреатит, ишемия нервных тканей, энцефаломиелит и др. Доказано, что при введении в организм ПП:

- на моделях рассеянного склероза уменьшается образование деструктивных и энцефалитогенных пептидов;
- на моделях поствакционального энцефаломиелита уменьшается смертность;
- на моделях хронического панкреатита нормализуется эндокринная функция поджелудочной железы и уменьшается смертность;

- на моделях атрофии зрительного нерва улучшается процесс обмена веществ зрительного нерва, что можно объяснить активацией гликолиза опорных тканей [1].

Полипrenoлы – группа биологически активных веществ, обладающих широким спектром действия. В частности, они являются необходимыми компонентами мембран, как животных, так и растительных клеток, а также участвуют в процессах обмена белков и углеводов. Основным источником поступления в организм животных и человека – растительная пища, где полипrenoлы находятся в неактивном виде. Для выполнения основных функций полипrenoлы в организме проходят процесс фосфорилирования, становясь полипренилфосфатами. При поступлении в организм фосфорилированных полипrenoлов, они очень быстро усваиваются клетками и расходуются на непосредственные нужды организма. Таким образом, только фосфорилированные полипrenoлы являются метаболически активными, участвуют в ряде биологических процессов, и в этом их главное и существенное преимущество по сравнению с нефосфорилированными производными [5].

Ропрен нормализует процессы окислительного фосфорилирования на уровне клеточного метаболизма. Способствует восстановлению мембран гепатоцитов путем конкурентного ингибирования перекисных процессов. В печени метаболизируется в долихол, участвующий в гликозилировании мембранных белков и образовании гликопротеинов. Нормализует дезинтоксикационную функцию печени [4].

Предпосылки возможного влияния полипrenoлов на нейрогенез:

- 1) Показано, что деление стволовых клеток мозга управляется генами, связанными с синтезом липидов, а полипrenoлы активно влияют на липидный обмен.
- 2) Известно, что антиоксиданты, к числу которых относятся полипrenoлы, оказывают существенное влияние на нейрогенез.

3) Долихолфосфатный цикл является необходимым метаболическим звеном в процессах регенерации, дифференциации и пролиферации клеток.

## **ГЛАВА 2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Объект исследования**

Работа выполнена на 18 мышах самцах линии CD-1 (возраст 8 недель на начало эксперимента), полученных из питомника ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН. Животные содержались при искусственном освещении (световой режим 12\12), комнатной температуре, со свободным доступом к пище и воде. В качестве корма использовался стандартный гранулированный корм.

Исследования проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

### **2.2 Схема эксперимента**

Животные были разделены на 4 экспериментальные группы: «Контроль», «Демиелинизация», «Ремиелинизация» и «Ропрен + демиелинизация». Животные группы «Демиелинизация» получали стандартный корм с 0.5% содержанием купризона в течение 10 недель. Животные группы «Ремиелинизация» получали стандартный корм с 0.5% содержанием купризона в течение 5 недель, после чего их переводили на стандартный гранулированный корм, которым их кормили в течение еще 5 недель. Животные группы «Ропрен + демиелинизация» также получали 0,5% купризон с пищей в течение 10 недель, им также ежедневно вводили Ропрен (препарат на основе полипренолов) в\б в дозе 12 мг\кг с 6й недели эксперимента. По окончании эксперимента животных умерщвляли под эфирным наркозом методом транскардиальной перфузии по большому кругу

кровообращения 4% параформальдегидом. Головной мозг крыс извлекли и на сутки помещали в 4% раствор формалина. Спустя 24 часа головной мозг извлекали из формалина и на сутки помещали в 10% раствор сахарозы, затем перемещали в 20% раствор сахарозы, после чего замораживали в парах жидкого азота и помещали в морозильную камеру на  $-80^{\circ}\text{C}$ . Фронтальные срезы головного мозга толщиной 10 мкм получали с помощью криотома HM525, окрашивали иммуногистохимически на даблкортин (DCX) – маркер молодых нейронов. Исследовали следующие зоны мозга: субвентрикулярную зону боковых желудочков (SVZ), гранулярный слой клеток и хилус зубчатой извилины (DG) гиппокампа. Микрофотографии срезов мозга были получены на флуоресцентном микроскопе Axioimager Z1 (CARL ZEISS).

### **2.3 Иммуногистохимическое окрашивание срезов**

*Протокол окраски на DCX:*

Приготовление растворов:

Маточный раствор PBS:

NaCl: 86 г

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O: 25 г

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O: 4,7

Азид натрия: 30 мг.

Довести объём до 1л дистиллированной водой

Рабочий раствор:

1 часть маточного р-ра + 9 частей дистиллированной воды

Блокирующий буфер:

PBS (рабочий р-р) 10 мл

Тритон 50 мкл

Азид натрия 2-3 мг

Сыворотка Donkey serum 15 мг

Первичные антитела:

goat anti DCX разведение 1 мкл. к 100 мкл. блокирующего буфера.

Вторичные антитела:

Donkey anti goat AF488 разведение 1 мкл вторичного антитела к 500 мкл блокирующего буфера.

ДЕНЬ 1

- 1) отмыть срезы в рабочем растворе PBS 3 раза по 5 минут
- 2) Покрывать блокирующим раствором на 1 час
- 3) Покрывать раствором первичных антител

ДЕНЬ 2

- 1) Промыть срезы 3 раза по 5 минут в рабочем растворе PBS
- 2) Покрывать раствором вторичных антител на 3 часа
- 3) Промыть срезы 3 раза по 5 минут в рабочем растворе PBS
- 4) Mounting medium with DAPI 20 мкл на стекло
- 5) Накрывать покровным стеклом
- 6) Смотреть через 30 минут

## 2.4 Статистический анализ

Полученные данные были статистически обработаны в программе Statistica (версия 10.0). Результаты выражают среднеарифметические значения  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, используемого для двух независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  [7].

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализировано влияние купризоновой демиелинизации и полипренолов на нейрогенез у мышей (Рисунки 1,2,3).

### 3.1 Субвентрикулярная зона

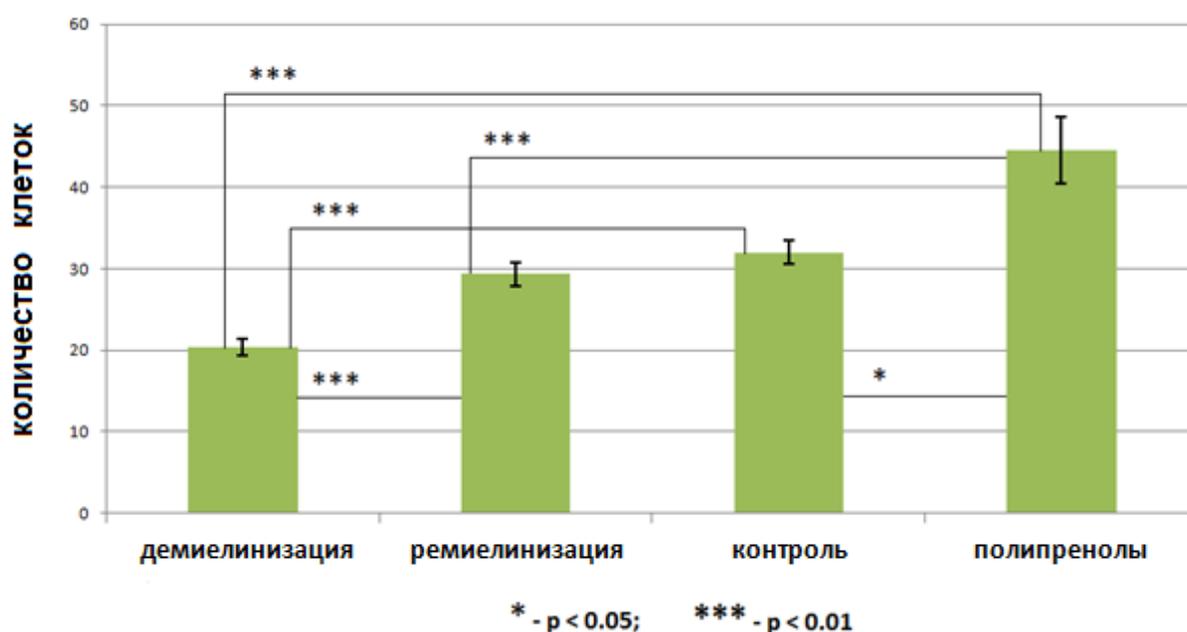


Рисунок 1. Количество молодых нейронов в SVZ, полученное для четырех групп мышей.

В субвентрикулярной зоне при купризоновой демиелинизации уменьшается количество молодых нейронов по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,01$ ).

Статистически значимых различий между контрольной группой и группой ремиелинизации нет ( $p > 0,05$ ).

У группы мышей, получавших препарат на основе полипренолов, уровень нейрогенеза повышен по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

У группы мышей, получавших препарат на основе полипренолов, по сравнению с группой мышей, у которых ремиелинизация происходила без применения препарата на основе полипренолов, уровень нейрогенеза значимо выше ( $p < 0,01$ ).

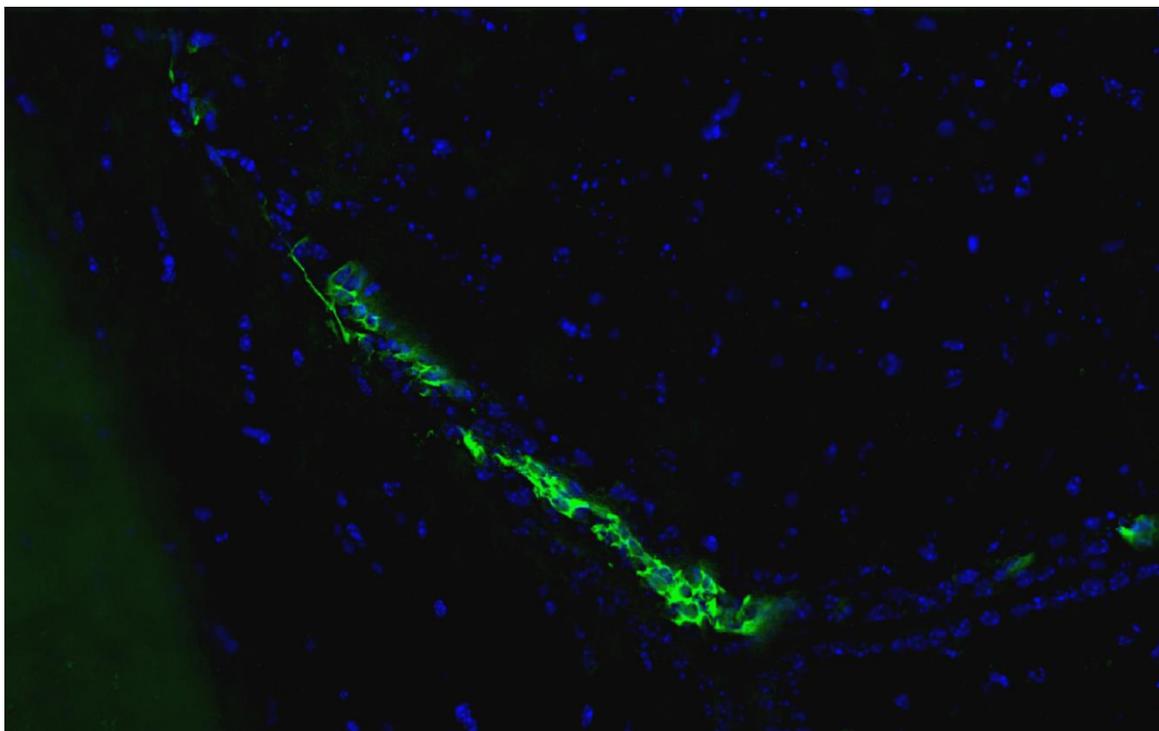


Рисунок 2. Молодые нейроны в субвентрикулярной зоне (группа ремиелинизации).

### 3.2 Гранулярный слой клеток зубчатой извилины гиппокампа

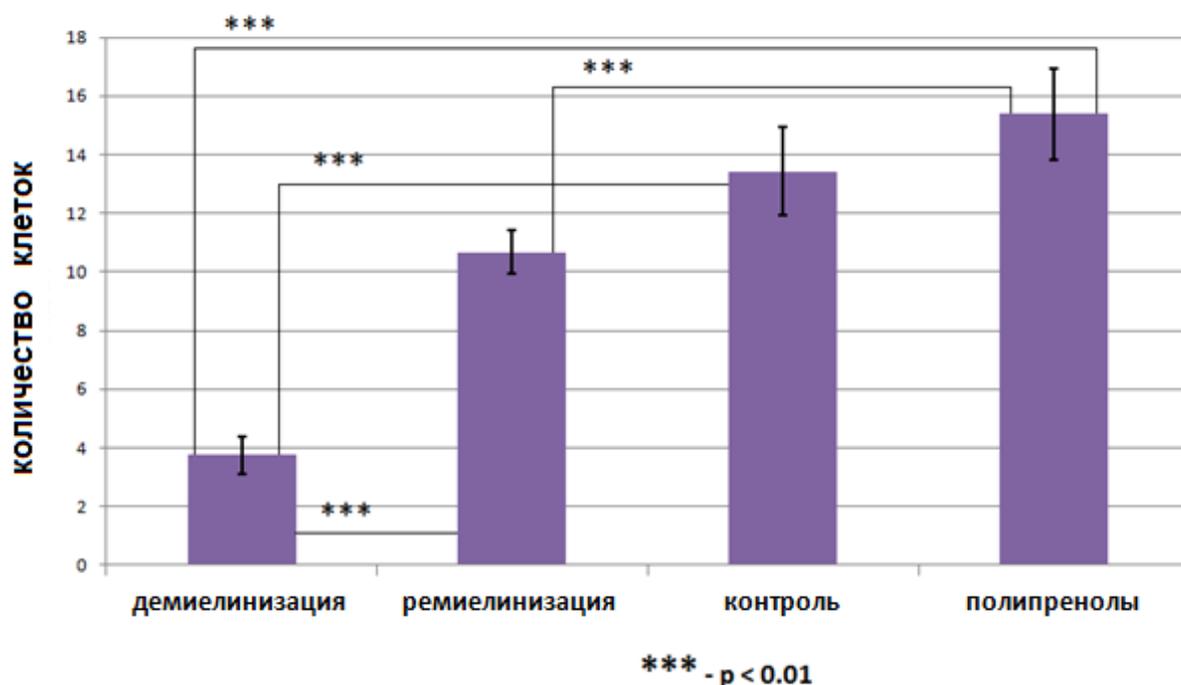


Рисунок 3. Количество молодых нейронов в гранулярном слое DG, полученное для четырех групп мышей.

В гранулярном слое клеток зубчатой извилины гиппокампа при купризоновой демиелинизации уменьшается количество молодых нейронов по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,01$ ).

Статистически значимых различий между контрольной группой и группой ремиелинизации нет ( $p > 0,05$ ).

Статистически значимых различий между контрольной группой и группой мышей, получавших препарат на основе полипrenoлов, нет ( $p > 0,05$ ).

У группы мышей, получавших препарат на основе полипrenoлов, по сравнению с группой мышей, у которых ремиелинизация происходила без применения препарата на основе полипrenoлов, уровень нейрогенеза значимо выше ( $p < 0,01$ ).

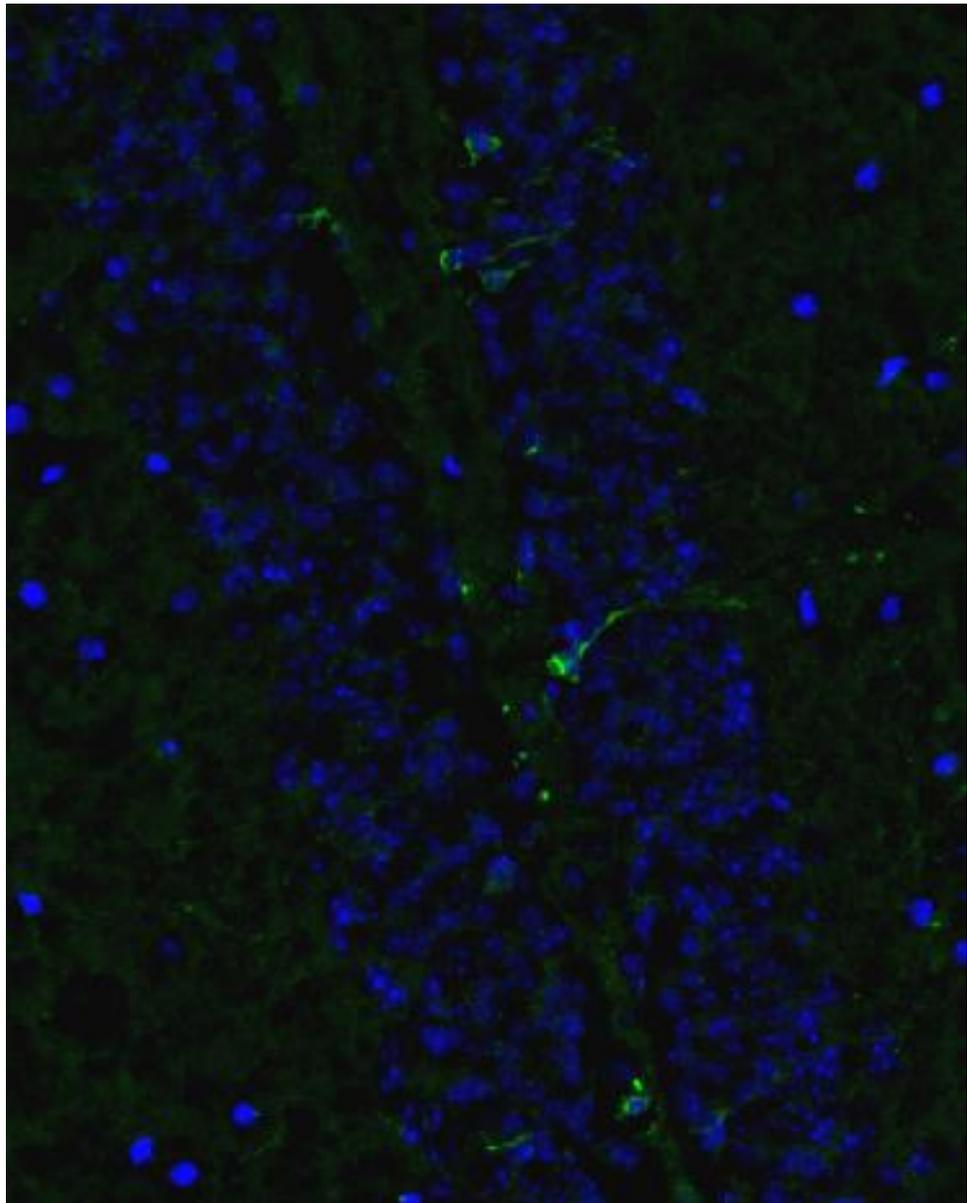


Рисунок 4. Молодые нейроны в зубчатой извилине гиппокампа (группа ремиелинизации).

### 3.3 Хилус зубчатой извилины гиппокампа

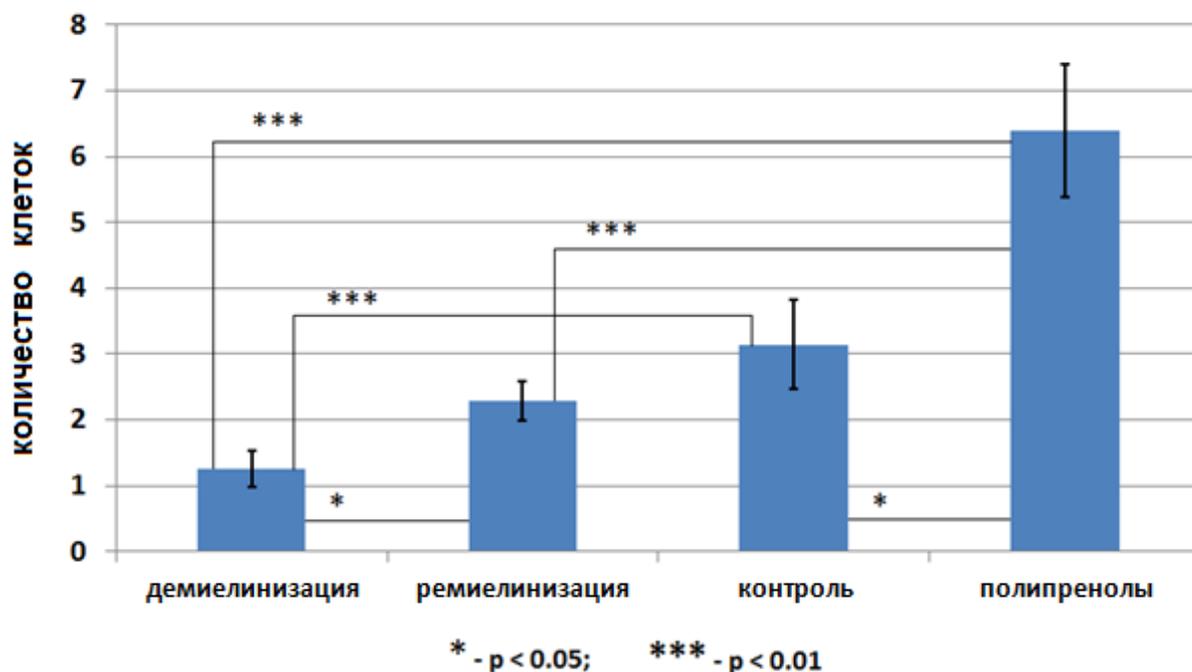


Рисунок 5. Количество молодых нейронов в хилусе DG, получено для четырех групп мышей.

В хилусе зубчатой извилины при купризоновой демиелинизации уменьшается количество молодых нейронов по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,01$ ).

Статистически значимых различий между контрольной группой и группой ремиелинизации нет ( $p > 0,05$ ).

У группы мышей, получавших препарат на основе полипrenoлов, уровень нейрогенеза повышен по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

У группы мышей, получавших препарат на основе полипrenoлов, по сравнению с группой мышей, у которых ремиелинизация происходила без применения препарата на основе полипrenoлов, уровень нейрогенеза значимо выше ( $p < 0,01$ ).

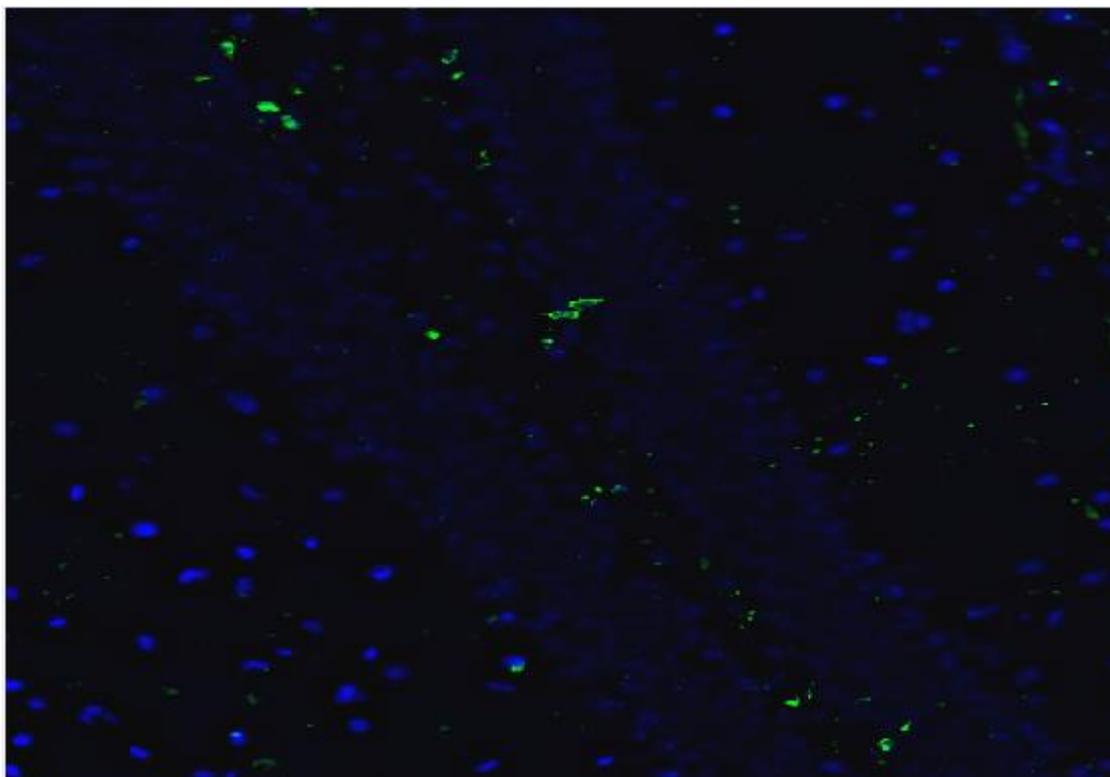


Рисунок 6. Молодые нейроны в зубчатой извилине гиппокампа (группа ремиелинизации).

### **3.4. Обсуждение результатов**

Согласно полученным результатам, вызванная купризоном демиелинизация достоверно снижает нейрогенез в субвентрикулярной зоне боковых желудочков, зубчатой извилине гиппокампа.

Прекращение введения купризона приводит к восстановлению уровня нейрогенеза до контрольных значений.

Несмотря на нейродегенерацию в активных очагах рассеянного склероза, состояния обострения болезни обратимы благодаря значительным возможностям компенсации нейрональной гибели. В качестве причины нестойкой, обратимой инвалидизации рассматривается демиелинизация. Одним из механизмов компенсации является ремиелинизация. Завершение

воспалительной фазы способствует активации ремиелинизации, а также стимулирует секрецию нейротрофических факторов, имеющих важное значение для функционирования нервной системы. Уменьшение выраженности воспалительных реакций с удалением продуктов воспалительных реакций является основной базой регресса неврологического дефицита [10].

Результаты эксперимента, показывающие восстановление уровня нейрогенеза до контрольных значений, согласуются с литературными данными.

Долихолфосфатный цикл является необходимым метаболическим звеном в процессах регенерации, дифференциации и пролиферации клеток [1].

При демиелинизации нарушается функционирование долихолфосфатного цикла на уровне мембран клетки, повышается вывод долихоллов из организма и наблюдается их дефицит. Это нарушает нормальное функционирование клеток, так какДФЦ играет главную роль в процессе синтеза гликопротеинов и гликоаминогликанов. Процесс гликолизации мембранных белков является очень важным для нормального функционирования клетки, так как это предотвращает протеолиз белков в процессе синтеза. Структуральное сходство долихоллов и полипренолов позволяет использовать Ропрен в качестве стабилизатора долихолфосфатного цикла. В печени полипренолы метаболизируются в долихол, участвующий в гликозилировании мембранных белков и образовании гликопротеинов [5].

Полученные результаты позволяют обосновывать возможность применения полипренолов для профилактики различных патологий и для стабилизации действияДФЦ и, возможно, для лечения рассеянного склероза.

## **Выводы**

1. При купризоновой демиелинизации наблюдается значительное снижение уровня нейрогенеза в основных нейрогенных зонах головного мозга.
2. Отмена введения купризона повышает уровень нейрогенеза в основных нейрогенных зонах головного мозга до контрольных значений.
3. Введение полипренолов на фоне вызванной купризоном демиелинизации повышает уровень нейрогенеза в основных нейрогенных зонах головного мозга.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакунина Н.С., Глушаков Р.И., Тапильская Н.И., Шабанов П.Д. Фармакология полипrenoлов как адаптогенов, снижающих интенсивность процессов гликирования. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2013. – N 4. – С. 44-53.
2. Быков В.Л. Цитология и общая гистология. СПб.: СОТИС, 1999. — С. 18-19.
3. Гусев Е.И. Глава 5. Рассеянный склероз // Болезни нервной системы // Под редакцией Яхно Н.Н., Штульмана Д.Р. — 3-е. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1. — С. 451-452.
4. Дробленков А.В., Монид М.В., Валькович Э.И. Воздействия церебропротектора ропрена у крыс. Изд.: Морфология, 2014 г. 2014. – N 1. – С. 24-27.
5. Зарубина И.В., Шабанов П.Д., Soultanov V.S. К механизму противоопиоидного действия полипrenoлов // Медицинский академический журнал, 2011. – N 2. – С. 25-32.
6. Кучинскене Д.И. Клиническое значение определения антител к основному белку миелина у больных рассеянным склерозом, ретробульбарным невритом и здоровых родственников // Автореферат диссертации канд. мед. наук. 1992.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
8. Функциональное значение нейрогенеза у взрослых. Ekdahl C.T. and al. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain // PNAS, november 11, 2008, vol. 100. т N23.
9. Хохлов А.П., Савченко Ю.Н. Миелитопатии и демиелинизирующие заболевания, Медицина. 1990.

10. ШМИДТ Т.Е., ЯХНО Н.Н. Рассеянный склероз. 2010, М., МЕДпресс-информ, с.267.
11. Abrous D.N., Koehl M., Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *PhysiolRev.* 2005 Apr; 85(2):523-69. Review.
12. Aloe L., Iannitelli A., Triaca V. Nerve growth factor and multiple sclerosis: studies on animal models and in humans. *Ann Ist Super Sanita* 2004; 40: 89-99.
13. Altman J., Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? // *Science, New Series, Vol.135, No. 3509, 1127-1128, Mar. 30, 1962.*
14. Amanda Sierra, Juan M. Encinas, Mirjana Maletic-Sasatic – Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Jan and Dan Duncan Neurological Research Institute at Texas Children’s Hospital, Houston, TX, USA. *Frontiers in Neuroscience, April 2011, Volume 5.*
15. Asano, M., Wakabayashi, T., Ishikawa, K., Kishimoto, H. Mechanism of the formation of megamitochondria by copper-chelating agents. // IV. Role of fusion phenomenon in the cuprizone-induced megamitochondrial formation. // *ActaPathol.* 1978. Jpn. 28, 205-213.
16. Baumann, N., Pham-Dinh, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in themammalian central nervous system. // *Physiol.* 2001. Rev. 81, 871–927.
17. Benetti, F., Ventura, M., Salmini, B., Ceola, S., Carbonera, D., Mammi, S., et al., 2010. //Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. // *Neurotoxicology* 31, 509–517.
18. Biancotti, J.C., Kumar, S., de Vellis, J., 2008. // Activation of inflammatory response by a combination of growth factors in cuprizone-induced demyelinated brain leads to myelin repair. // *Neurochem. Res.* 33, 2615–2628.
19. Butzkuenen H., Zhang J.G., Soilu-Hanninen M. et al. LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat Med* 2002; 8: 613-619.

20. Craner M.J., Newcombe J., Black J.A. et al. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8168-8173.
21. Caroni P., Schwab M.E. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 1988; 106: 1281-1288.
22. Comi G. The physiopathology of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis: recovery of function and neurorehabilitation*. Ed. By Kesserling G., Comi G., Thompson A.J. Cambridge University Press 2010. 8-21.
23. Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N., Berliner E., The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody, *J. Immunol.* 45, 1942, 159-170.
24. A.H. Coons, M.H. Kaplan, Localization of antigen in tissue cells // II. improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody, *J. Exp. Med.*, 91(1). 1-13.
25. Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 2005.
26. Chang A., Smith M.C., Yin X. et al. Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis. *Brain* 2008; 131: 2366-2375.
27. Danilov A.I., Covacu R., Moe M.C. et al. Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 394-400.
28. De Santi L., Polimeni G., Cuzzocrea S. et al. Neuroinflammation and neuroprotection: an update on (future) neurotrophin-related strategies in multiple sclerosis treatment. *Curr Med Chem* 2011; 18: 1775-1784.
29. Dewar, D., Underhill, S.M., Goldberg, M.P. Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003. 23, 263–274.

30. Doan, V., Kleindienst, A.M., McMahon, E.J., Long, B.R., Matsushima, G.K., Taylor, L.C., 2013. Abbreviated exposure to cuprizone is sufficient to induce demyelination and oligodendrocyte loss. *J. Neurosci. Res.* 91, 363–373.
31. Dutta R., Trapp B.D. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 2011; 93: 1-12.
32. Felts P.A., Baker T.A., Smith K.J. Conduction in segmentally demyelinated mammalian central axons. *J Neurosci* 1997; 17: 7267-7277.
33. Felts P.A., Smith K.J. Conduction properties of central nerve fibers remyelinated by Schwann cells. *Brain Res* 1992; 574: 178-192.
34. Filippi M., Rocca M.A. Functional MR imaging in multiple sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* 2009; 19: 59-70.
35. Foster R.E., Whalen C.C., Waxman S.G. Reorganization of the axon membrane in demyelinated peripheral nerve fibers: morphological evidence. *Science* 1980; 210: 661-663.
36. Goldberg, J., Daniel, M., van Heuvel, Y., Victor, M., Beyer, C., Clarner, T., et al., 2013. Short-term cuprizone feeding induces selective amino acid deprivation with concomitant activation of an integrated stress response in oligodendrocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33, 1087–1098.
37. Gray P.T., Ritchie J.M. Ion channels in Schwann and glial cells. *Trends Neurosci* 1985; 8: 411-415.
38. H.van Praag and al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, vol.415, 2008.
39. Hemm, R.D., Carlton, W.W., Welser, J.R., 1971. Ultrastructural changes of cuprizone encephalopathy in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18, 869-882.
40. Hohlfeld R., Kerschensteiner M., Stadelmann C. et al. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2006; 27: 1-7.

41. Kerschensteiner M., Bareyre F.M., Buddeberg B.S. et al. Remodeling of axonal connections contributes to recovery in an animal model of multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 200: 1027-1038.
42. Kesslerling J., Comi G., Thompson A.J. (ed.) Multiple sclerosis: recovery of function and neurorehabilitation. Cambridge University Press 2010. 247.
43. Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., Beyer, C., 2009. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *ActaNeuropathol.* 118, 723-736.
44. Kirschner D.A., Blaurock A.E. In: Myelin. Biology and chemistry. (R.E. Martenson, ed.), CRC Press: Boca Raton, Florida. 1991. 413-448.
45. Konig, R., Stillfried, M., Aperdannier, P., Clarner, T., Beyer, C., Kipp, M., et al., 2012. Expression of retinoid X receptor beta is induced in astrocytes during corpus callosum demyelination. *J. Chem. Neuroanat.* 43, 120-132. Kotter, M.R., Li, W.W., Zhao, C., Franklin, R.J., 2006. Myelin impairs.
46. Kuznetsovs S., Daugavietis M.O., Kuznetsova G.V. Urinal dolichols in multiple sclerosis patients with movement disorders. *Movement Disorders*, Vol.11, Suppl.1. 141. 1996.
47. Leibscher T., Schnell L., Schnell D. et al. Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Ann Neurol* 2005; 58: 706-719.
48. Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W., Levison, S.W., 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* 89, 1092-1100.
49. McMahon, E.J., Suzuki, K., Matsushima, G.K., 2002. Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 130, 32-45.

50. Messori, L., Casini, A., Gabbiani, C., Sorace, L., Muniz-Miranda, M., Zatta, P., 2007. Unravelling the chemical nature of copper cuprizone. *Dalton Trans.* (21), 2112-2114.
51. Moalem G., Leibowitz-Amit R., Yoles E. et al. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 1999; 5: 49-55.
52. Pluchino S., Furlan R., Muzio L., Martino G. Tissue regeneration and repair in multiple sclerosis: the role of neuronal stem cells. *Multiple sclerosis: recovery of function and neurorehabilitation*. Ed. By G. Kesserling, G. Comi, A.J. Thompson. Cambridge University Press 2010; 60-66.
53. Prineas J.W., Barnard R.O., Kwon E.E. et al. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 1993; 33: 137-151.
54. Prineas J.W., Barnard R.O., Revesz T. et al. Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions. *Brain* 1993; 116: 681-693.
55. Raineteau O., Fouad K., Noth P. et al. Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6929-2934.
56. Rist J.M., Franklin R.J.M. The adult human oligodendrocyte precursor cell: a key player in myelin repair. *Multiple sclerosis: recovery of function and neurorehabilitation*. Ed. By G. Kesserling, G. Comi, A.J. Thompson. Cambridge University Press 2010; 53-59.
57. Rocca M.A., Absinta M., Valsasina P. et al. Abnormal connectivity of the sensorimotor network in patients with MS: a multicenter fMRI study. *Hum Brain Mapp* 2009; 30: 2412-2425.
58. Rocca M.A., Colombo B., Falini A. et al. Cortical adaptation in patients with MS: a cross-sectional functional MRI study of disease phenotypes. *Lancet Neurol* 2005; 4910: 618-626.

59. Rossi, L., Lombardo, M.F., Ciriolo, M.R., Rotilio, G., 2004. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. *Neurochem. Res.* 29, 493–504.
60. Ruch A.M., Dib-Hajj S.D., Waxman S.G. Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Nav1.2 and Nav1.6, expressed in mouse spinal sensory neurones. *J Physiol* 2005; 564: Pt 3: 803-815.
61. Smith K.J. Sodium channels and multiple sclerosis: roles in symptom production, damage and therapy. *Brain Pathol* 2007; 17: 230-242.
62. Wakabayashi, T., 2002. Megamitochondria formation—physiology and pathology. *J. Cell. Mol. Med.* 6, 497–538.
63. Wang X., Chun S.J., Treloar H. et al. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci* 2002; 22: 5505-5515.
64. Waxman S.G. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 932-941.
65. Waxman S.G. Demyelination in spinal cord injury. *J Neurol Sci* 1989; 91: 1-14.
66. Waxman S.G. The perinodal astrocytes functional and developmental considerations. *Biology and Pathobiology of Astrocyte-Neuron Interactions*. Eds. Fedoroff S., Doucette R., Juurlink B.H. New York: Plenum 1993; 15-29.
67. Wegner C., Filippi M., Korteweg T. et al. Relating functional changes during hand movement to clinical parameters in patients with multiple sclerosis in a multi-centre fMRI study. *Eur J Neurol* 2008; 15: 113-122.
68. Yang Y., Liu Y., Wei P. et al. Silencing Nogo-A promotes functional recovery in demyelinating disease. *Ann Neurol* 2010; 67: 498-507.
69. Zimarino V., Ripamonti M., Belfiore M. et al. Synaptic changes in multiple sclerosis: Do they occur? How effectively can they be analyzed? *Multiple sclerosis: recovery of function and neurorehabilitation*. Ed. By G. Kesserling, G. Comi, A.J. Thompson. Cambridge University Press 2010; 22-28.

70. Zorner B., Schwab M.E. Basic mechanisms of functional recovery. Multiple sclerosis: recovery of function and neurorehabilitation. Ed. By G. Kesserling, G. Comi, A.J. Thompson. Cambridge University Press 2010; 44-52.

Введите текст:

...или загрузите файл:

Файл не выбран...

Выбрать файл...

Укажите год публикации: 2016 ▾

Выберите коллекции

Все

Рефераты

Авторефераты

Иностранные конференции

Википедия

Российские конференции

Иностранные журналы

Российские журналы

Энциклопедии

Англоязычная википедия

Анализировать

Обработан файл:  
ВКР Кургин 2016.docx.

Год публикации: 2016.

Оценка оригинальности документа - 97.49%

Процент условно корректных заимствований - 0.0%

Процент некорректных заимствований - 2.51%

Время выполнения: 14 с.

Документы из базы

Источники заимствования

**1. Нейрогенез (<https://ru.wikipedia.org/wiki?curid=1264129>)**

Год публикации: 2015. Тип публикации: статья википедии.

<https://ru.wikipedia.org/wiki?curid=1264129> (<https://ru.wikipedia.org/wiki?curid=1264129>)[Показать заимствования \(7\)](#)В списке  
литературыИсточники  
Заимствования

1.63%

**2. Рассеянный склероз (<https://ru.wikipedia.org/wiki?curid=303128>)**

Год публикации: 2015. Тип публикации: статья википедии.

<https://ru.wikipedia.org/wiki?curid=303128> (<https://ru.wikipedia.org/wiki?curid=303128>)[Показать заимствования \(3\)](#)

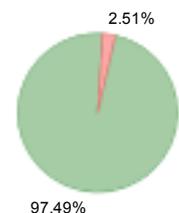
0.47%

**3. Шпаргалка: Шпаргалка по Медицине 2 (<http://www.bestreferat.ru/files/49/bestreferat-241749.docx>)**

Год публикации: 2015. Тип публикации: реферат.

<http://www.bestreferat.ru/files/49/bestreferat-241749.docx><http://www.bestreferat.ru/files/49/bestreferat-241749.docx>)[Показать заимствования \(3\)](#)

0.41%

[Значимые оригинальные фрагменты](#)[Дополнительно](#)[Библиографические ссылки](#)

[Искать в Интернете](#)

© 2015 2016 Институт системного анализа Российской академии наук (<http://www.isa.ru/index.php?lang=ru>)