

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМБИНИРОВАННОГО  
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНА  
С ЦИТИКОЛИНОМ НА ПРОЦЕССЫ  
ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ НЕЙРОНОВ  
КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА  
И ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЕГО  
ОБРАЗОВАНИЙ В УСЛОВИЯХ РАССЕЯННОГО  
СКЛЕРОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*Александр Нефедов, кандидат медицинских наук, доцент,  
Виталий Мамчур, доктор медицинских наук, профессор,  
ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»  
Ирина Маража, преподаватель,  
Днепропетровский медицинский институт  
традиционной и нетрадиционной медицины*

*Study of combined use of methylprednisolone with citicoline to processes of energy providing of mitochondria to cortical neurons of the brain and histomorphometric indicators of its formation in the conditions of multiple sclerosis in the experiment.*

*Annotation. The paper presents the analysis of the pharmacological effect of methylprednisolone with citicoline to neuroprotective processes of energy providing of mitochondria of neurons of the cerebral cortex and histomorphometric indices in experimental allergic encephalomyelitis. Comprehensive introduction of the drug has a significant effect on the mitochondrial dysfunction (reduction in speed of opening of mitochondrial pores, increasing the charge of the inner membrane) and energy metabolism of the brain (increased levels of ATP and ADP, reduced lactate, pyruvate, and increase in isocitrate). The combined use of methylprednisolone with citicoline limit unproductive activity of anaerobic glycolysis and increases the aerobic reaction.*

*Keywords: experimental allergic encephalomyelitis, mitochondria, neurons, citicoline, methylprednisolone.*

Клиническое многообразие РС обусловлено не только ведущими (ядерными) симптомами, свидетельствующими о поражении различных функциональных систем, но и большим спектром когнитивных, аффективных и других психопатологических расстройств, существенно влияющих на повседневную активность и осложняющих проведение лечебных и реабилитационных мероприятий, особенно при выраженном неврологическом дефиците.

Среди многообразных психопатологических нарушений при РС ведущее значение приобретают когнитивный дефицит разной степени тяжести, астенический симптомокомплекс, тревожно-фобические расстройства, депрессивный синдром [1, 2]. Степень выраженности нейропсихологических нарушений, по данным некоторых авторов, связана с различной локализацией очагов демиелинизации и дегенерации, в первую очередь в перивентрикулярных зонах, мозжечке, лобной коре, мозолистом теле [3, 4]. Другие исследователи не нашли прямой

ассоциации между тяжестью нейропсихологических, в первую очередь психоэмоциональных, нарушений и выраженностью очагового поражения мозга при РС. Эти нарушения также не всегда коррелируют с физическим состоянием, степенью инвалидизации, данными магнитно-резонансной томографии. Вместе с тем они значительно ухудшают качество жизни большинства пациентов, что находит отражение в различных показателях, которые выявляют с помощью шкал стандартных опросников [2, 5].

Всемирная организация здравоохранения определяет «качество жизни» как индивидуальное соотношение места человека в жизни общества в контексте культуры, систем ценностей, которые декларирует данное общество, и целей конкретного индивидуума, его планов, возможностей, степени общей неустроенности. По сути понятие «качество жизни» — это физическое и социальное благополучие, каким его воспринимает сам человек, включая удовлетворенность уровнем своей физической, психологической, социальной и духовной жизни (Всемирная организация здравоохранения, 1995). К сожалению, в клинической медицине при оценке состояния больного РС основное внимание уделяют поражению различных функциональных систем, то есть степени выраженности неврологического дефицита, тогда как психоэмоциональному состоянию, включая особенности индивидуума, уровень его независимости, социальное положение, отношение к болезни и ряду других аспектов, уделяют недостаточно внимания.

В последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих о значимой, если не ведущей роли — нейродегенеративных процессов в патогенезе рассеянного склероза и становится очевидным, что уже на ранних этапах рассеянного склероза развивается нейрональное и аксональное нейродегенеративное повреждение [6]. Причем повреждение аксонов наблюдается не только в очагах демиелинизации, а распространяется вдоль всего аксонального волокна [7, 8].

В связи с установленными в последние годы фактами, в настоящее время рассеянный склероз рассматривается не только как аутоиммунное демиелинизирующее заболевание, но и как нейродегенеративное заболевание [9, 10].

При этом вопросы взаимоотношений иммунного воспаления и нейродегенерации (или их приоритетности, ведущей, определяющей клиническую картину роли — в каждый временной отрезок заболевания) во многом остаются неясными.

Достоверно показано, что даже в фазе полной клинической ремиссии активность рассеянного склероза сохраняется, что подтверждается появлением новых очагов демиелинизации (по данным магнитно-резонансной томографии), повреждением аксонов центральных проводящих систем и продолжающимися нарушениями в иммунной системе. Таким образом, рассеянный склероз не является в полном смысле слова «ремиттирующим» заболеванием [11].

Данные, полученные в последние годы с помощью морфологических, иммунологических и нейровизуализационных методов исследований, в значительной степени изменили традиционные представления о рассеянном склерозе как о заболевании Центральной нервной системы, имеющем ремиттирующее течение и

приводящем к разрушению только миелина проводников головного и спинного мозга.

Оказалось, что даже в фазе клинической ремиссии рассеянного склероза патологический процесс продолжается.

Использование протонной магнитно-резонансной спектроскопии позволило у половины пациентов (48,6%) независимо от срока давности заболевания определить биохимические изменения экстрафокального белого вещества, указывающие на наличие диффузной демиелинизации. Снижение пика N-ацетиласпартат (NAA) в области гиппокампа, например, определялось до развития его атрофии, выявляемой с помощью МРТ [12].

В результате обследования с помощью суперпозиционного электромагнитного сканера (СПЭМС), разработанного акад. Н. П. Меткиным (патент на изобретение 2290869) больных с вторично-прогрессирующим рассеянным склерозом в фазе ремиссии — получены данные, указывающие на глубокие метаболические нарушения специфического и неспецифического характера, заключающиеся в [12]: лактатацидозе, тканевой гипоксии, вследствие нарушения функции каскада дыхательных ферментов убихинона и цитохрома, повышении перекисного окисления с появлением гидроперекисей, снижении функциональной активности нейротрансмиттеров.

Показано, что помимо белого вещества головного мозга, с самого начала развития рассеянного склероза страдают осевые цилиндры нервного волокна и поражается серое вещество коры и подкорковых образований.

Таким образом — разные варианты течения рассеянного склероза, гетерогенность его клинических проявлений, разный эффект иммуномодулирующей терапии при одинаковых клинических формах заболевания предполагают наличие различных патогенетических механизмов повреждения ЦНС при рассеянном склерозе.

Можно говорить о том, что в развитии и дальнейшем прогрессировании рассеянного склероза лежат не только многообразные этиологические факторы, но различные патогенетические механизмы.

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что при рассеянном склерозе имеют место 2 основных патологических процесса: очаговое иммунное воспаление с образованием периваскулярных воспалительных инфильтратов в головном и спинном мозге, нейродегенерация, проявляющаяся диффузным повреждением аксонов и апоптозом нейронов. И именно этот процесс является основным фактором прогрессирующего неврологического дефицита [6].

Воспалительные и дегенеративные процессы в ЦНС при рассеянном склерозе различаются по проявлениям, течению, биохимическим и нейровизуализационным характеристикам, морфологии и ответам на терапию [13].

Патологическое повреждающее воздействие миелин-реактивных Т-лимфоцитов и антител запускает цепь биохимических процессов, способствующих разрушению миелина. Вклад в разрушение миелина при рассеянном склерозе вносит оксид азота [14], вырабатываемый в очагах иммунного воспаления активированными макрофагами и клетками микроглии. Действие оксида азота

связано с его способностью разрушать митохондрии. Прогрессированию нейродегенеративного процесса при рассеянном склерозе может также способствовать нейротоксический глутамат, накопление которого фиксируется в очагах демиелинизации. В патологический процесс также вовлекается экстрацеллюлярный матрикс. Дополнительно — в воспалительных очагах — также отмечается повышенная активность металлопротеиназ. Металлопротеиназы способны повышать проницаемость ГЭБ и, таким образом, способствовать проникновению через ГЭБ провоспалительных клеток и цитокинов [15].

Таким образом, патологический аутоиммунный процесс вызывающий развитие рассеянного склероза — развивается у индивидов с генетически предопределенным несовершенством регуляции иммунной системы и, как правило, на фоне хронического, истощающего иммунную систему действия персистирующих инфекций, что приводит к нарушению регуляции естественных аутоиммунных реакций, выходу из под контроля иммунной системы и клональной активации специфических аутоиммунных лейкоцитов. Развивается аутоиммунная агрессия против собственной нервной ткани, преимущественно миелина, которая обусловлена образованием клона аутореактивных иммунокомпетентных клеток [19].

С другой стороны, постепенное и неуклонное нарастание инвалидизации, как это происходит при вторично-прогрессирующем рассеянном склерозе и первично-прогрессирующем рассеянном склерозе, более типично для течения дегенеративного процесса.

Именно нейродегенерация лежит в основе нарастания неврологического дефицита и необратимой симптоматики, что находит свое отражение в формировании так называемых стойких «черных дыр» (участков необратимой гибели аксонов) и развитии атрофии головного и спинного мозга, видимых при МРТ [11].

Наличие нейродегенеративного компонента в развитии рассеянного склероза подтверждается: морфологическими данными, свидетельствующими о повреждении и гибели не только аксонов, но и самих нейронов, развитием атрофического процесса в головном и спинном мозге. Магнитно-резонансная спектроскопия выявляет заметное снижение уровня основного маркера сохранности аксонов и нейронов — N-ацетиласпартата (NAA) как в очагах, так и в «нормально выглядящем» при МРТ-исследовании белом и сером веществе головного мозга.

Разные «пороги» развития нейродегенеративного процесса, перестояющего зависят от процессов иммунного воспаления, по-видимому, обусловлены возрастом и связанным с ним снижением нейропластичности, а также генетическими особенностями отдельных пациентов [16].

К сожалению — причины нейродегенерации при рассеянном склерозе до конца неясны [6]. Нет полной ясности и в взаимосвязи процессов иммунного воспаления и нейродегенерации.

Таким образом, демиелинизация при рассеянном склерозе связана как с аутоиммунными воспалительными процессами, так и с первичной дегенерацией олигодендроцитов.

При этом 1-й и 2-й типы разрушения миелина наиболее характерны для ремиттирующего течения рассеянного склероза.

А 3-й и 4-й типы — для прогрессирующего рассеянного склероза, Наличие 4 патогенетических типов демиелинизации предполагает и 4 разных патологических процесса.

В этой связи — концепция о том, что Рассеянный склероз является единой болезнью (а не синдромом), подвергается сомнению.

Вместе с тем — работами ряда исследователей показано, что при рассеянном склерозе наряду с процессами демиелинизацией идут и процессы — ремиелинизации. В первую очередь это происходит по краям активной бляшки [17, 18]. Процесс ремиелинизации очень медленный и еще более замедляется по мере увеличения длительности заболевания.

Ранее считали, что основным механизмом хронизации течения рассеянного склероза является только повреждение олигодендроцитов и нарушение их способности осуществлять ремиелинизацию, но последние исследования показывают, что необратимые изменения в большей степени ассоциированы с процессами аксонального повреждения [9].

Тонкие механизмы повреждения аксонов пока изучены недостаточно. Близость наибольшего повреждения аксонов к местам воспалительной инфильтрации предполагает, что процессы аксонального повреждения тесно связаны с воспалительными процессами. Однако вопрос — какой из этих процессов первичен, а какой вторичен — до настоящего времени — остается спорным.

**Цель исследования.** Изучить влияние совместного введения метилпреднизолона и цитиколина на процессы энергообеспечения митохондрий нейронов коры головного мозга и гистоморфометрические показатели его образований в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелита.

**Материалы и методы исследований.** До начала выполнения работ комиссией по вопросам биоэтики утвержден протокол предстоящих исследований. Согласно требованиям GLP и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для опытных и других целей, согласованы все процедуры, связанные с содержанием животных, гуманным обращением с ними и их использованием в эксперименте.

Животных содержали в стандартных условиях со световым режимом день — ночь 12 час/12 час при температуре воздуха 20–22<sup>0</sup> С со свободным доступом к воде и пище. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) индуцировали однократной подкожной инокуляцией энцефалитогенной смеси (ЭГС) в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ) из расчета 100 мг гомогената гомологичного спинного мозга; 0,2 мл ПАФ (содержание убитых микобактерий 5 мг/мл) и 0,2 мл физиологического раствора на животное. ЭГС вводили в основание хвоста под легким эфирным наркозом в объеме 0,4 мл [Degano, Roth, 2000].

Для биохимических исследований использовали головной мозг экспериментальных белых крыс. Из головного мозга быстро удаляли кровь, отделяли от мозговой оболочки и исследуемые кусочки помещали в жидкий азот. Затем измельчали в жидком азоте до порошкообразного состояния и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды при (2<sup>0</sup>С), содержащей (в ммольях): сахарозы — 250, трис-НСl-буфера — 20, ЭДТА — 1 (рН 7,4). При температуре (+4<sup>0</sup>С) методом

дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге выделяли митохондриальную фракцию. Для очистки митохондриальной фракции от крупных клеточных фрагментов предварительно проводилось центрифугирование в течение 7 минут при 1000g, а затем супернатант повторно центрифугировали в течение 20 минут при 17000g. Супернатант сливали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Осадок митохондрий ресуспендировали в среде выделения, содержащей бычий сывороточный альбумин (0,5 мг/мл) и вновь осаждали в течение 10 минут при 17000 g. Митохондрии суспендировали в среде выделения, суспензия содержала 40–60 мг белка/мл. Для длительного хранения митохондрии замораживают при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для определения скорости потенциала внутренней мембраны митохондрий и открытия митохондриальной поры использовали суспензию 0,5–1,0 мг белка/мл.

О состоянии энергетического обмена судили по содержанию адениловых нуклеотидов- АТФ, АДФ и АМФ, а также по содержанию лактата, малата, пировата, изоцитрата и аспартата. Содержание АТФ, АДФ и АМФ и аспартата проводили методом тонкослойной хроматографии с последующей УФ-спектрометрией. Количественное определение содержания проводили пировата по методу Цоха-Лампрехта по убыли НАДН. Количественное определение малата проводили по методу Хохорста по нарастанию НАДН. Определение концентрации изоцитрата проводили по методу Зиберта по нарастанию НАДФН. Определение содержания лактата проводили по методу Хохорста по нарастанию НАДФН.

О формировании митохондриальной дисфункции судили по величине потенциала внутренней мембраны митохондрий и по степени набухания митохондрий. Потенциал, генерируемый на внутренней митохондриальной мембране, регистрировали на спектрофотометре, в двухволновом режиме (511–533 нм), с сафранином О в качестве потенциал-зависимого зонда (18 мкМ). Измерения проводили в стеклянной кювете 10x10 мм с рабочим объемом 2 мл. Измерение проводили в 0,62 мМ КСl; 40 мМ Caps (3-[циклогексиламино]-1-пропансульфоновая кислота)-КОН (рН = 10); Для рассеивания потенциала использовали протонифор-разобщитель FCCP (п-трифторметоксифенилгидразон) и антипортер моненсин. Набухание митохондрий регистрировали на спектрофотометре, по уменьшению оптической плотности митохондриальной суспензии при 540 нм

Активность общей КФК и ВВ-КФК определяли в сыворотке крови на автоматическом биохимическом Prestige 24i, используя набор фирмы Cormau.

Головной мозг экспериментальных животных помещали на сутки в фиксатор Буэна и после стандартной гистологической проводки ткань заключали в парафин. Для изучения морфологии нейронов на ротационном микротоме изготавливали срезы в области сенсомоторной коры толщиной 5 микрон. Срезы депарафинировали и окрашивали для определения нуклеиновых кислот галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону. Морфометрические исследования проводили на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия), увеличение x40. Изображение нейронов в области сенсомоторной коры, получаемые на микроскопе, с помощью высокочувствительной видеокамеры COHU-4922 (COCHU Inc., США) вво-

дили в компьютерную программно-аппаратную систему цифрового анализа изображения VIDAS, разработанную профессором кафедры патофизиологии, д. мед. н. А. В. Абрамовым. Анализ изображений проводили в полуавтоматическом режиме.

Дегенерирующими считались нейроны, имеющие признаки кариопикноза или цитолиза. Программно измерялась плотность расположения выживших и дегенерирующих нейронов, соотношение числа интактных нейронов к гибнущим (индекс нейродегенерации) и отношение плотности выживших нейронов при использовании препарата к плотности интактных нейронов в контрольной группе (индекс улучшения выживаемости). Так как часть погибших нейронов к моменту гистологического исследования уже была фагоцитирована клетками микроглии, отдельно оценивался индекс относительной активности микроглии, равный частному от деления разности в плотности выживших нейронов на разность в плотности дегенерирующих нейронов (разность между группой контроля и фармакологического препарата). Величина индекса нейродегенерации менее единицы свидетельствовала о преобладании числа гибнущих нейронов над выжившими, индекс улучшения выживаемости и активности микроглии более единицы свидетельствовали о позитивном действии фармакологического препарата, менее единицы — о негативном. О функциональном состоянии выживших нейронов судили на основании изменения площади ядер и ядрышек нейронов, содержания в них нуклеиновых кислот, ядерно-цитоплазматического соотношения и количества многоядрышковых клеток [28].

**Результаты и их обсуждение.** Моделирование экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) [20] приводило к стойкому нарушению энергетического метаболизма мозговой ткани- активации анаэробного гликолиза (повышение соотношения лактат/пируват), торможению окислению в цикле Кребса (снижение малата на 51% и изоцитрата на 45 %) и энергодефициту (уменьшение АТФ на 42%, АДФ на 43% фоне повышения АМФ на 82%) (табл.1). Моделирование ЭАЭ приводило и к торможению компенсаторных митохондриально-цитозольных шунтов выработке энергии, в частности малат-аспартатного шунта. Малат-аспартатный челнок осуществляет перенос восстановленных эквивалентов, образующихся в цитоплазме в ходе гликолиза, в митохондрии в условиях ишемии. Образующийся в цитоплазме в условиях пониженного содержания кислорода, НАДН<sup>+</sup> используется для превращения щавелевоуксусной кислоты в малат, и этот малат проникает в митохондрию и участвует в экспорте  $\alpha$ -кетоглутарата. Этот малат в митохондриях превращается в щавелевоуксусную кислоту с образованием НАДН, доступного для электроннотранспортной цепи (из 2 протонов образуются 3 молекулы АТФ). Образовавшаяся из малата щавелевоуксусная кислота превращается  $\alpha$ -кетоглутарат и аспартат.  $\alpha$ -Кетоглутарат идет из митохондрий в обмен на малат, а аспартат обменивается на глутамат. Перенос происходит за счет градиента глутамата и высокого внутримитохондриального отношения глутамат/аспартат. Соотношение НАДН/НАД<sup>+</sup> и малат/щавелевоуксусная кислота регулируется малатдегидрогеназой (МДГ). При моделировании ЭАЭ наблюдалось торможение малат-аспартатного шунта, что

выражалось в уменьшении уровня малата на 51%, и аспартата на 40% по сравнению с группой интакта (табл. 1). Подобные изменения, по всей видимости, являются последствиями вторичной митохондриальной дисфункции. Подтверждением этой гипотезы явились результаты исследования функциональной активности митохондрий, выделенных из нейронов головного мозга. Так, у нелеченных животных с ЭАЭ наблюдалось увеличение скорости открытия митохондриальной поры в 9,1 раза и падение потенциала внутренней мембраны митохондрий на 78%.

Известно, что при нейродеструкции как ишемической, так и воспалительной природы, NO (макрофагальный или экзогенный) ингибирует окислительное фосфорилирование в митохондриях клеток мишеней за счет обратимого связывания с цитохром-С-оксидазой митохондрии. Подавление электронного транспорта в митохондрии приводит к генерации супероксида и, как следствие, образованию ONOO<sup>-</sup>. Синтез пероксинитрита наблюдается в клетках с высокой активностью NO-синтазы и ферментов, продуцирующих АФК (ксантинооксидаза, НАДН-оксиредуктаза, циклооксигеназа, липоксигеназа, ферменты электронно-транспортной цепи). Последними исследованиями установлено, что на начальных стадиях ишемии уровень пероксинитрита может снижаться посредством митохондриальной нитроредуктазы, которая восстанавливает его с помощью НАДФН и НАДН в NO. Мишенями окислительной и нитрозирующей атаки пероксинитрита являются тиолы, CO<sub>2</sub>, металлопротеиды, нуклеиновые кислоты, метаболитотропные трансммиттеры и липиды. Пероксинитрит, являясь относительно стойким соединением, при смещении pH в кислую сторону быстро протонируется с образованием основного продукта — нитратаниона, а также гидроксилрадикала и диоксида азота, что обуславливает его окислительные свойства. Поэтому на начальных стадиях ишемии пероксинитрит взаимодействует с тиолами по типу нитрозилирования, в результате чего образуются нитрозотиолы; в дальнейшем при прогрессировании процесса и проявлении лактатацидоза взаимодействие происходит по типу окисления с образованием более стойких дисульфидов. Эти реакции вносят существенный вклад в механизмы нейродеструкции посредством смещения тиолдисульфидной системы в сторону окисленных тиольных соединений, снижения восстановительного потенциала клетки, нарушения экспрессии генов за счет необратимого окисления цистеиновых остатков редоксзависимых доменов, разобщения MAPкиназного каскада. Пероксинитрит тормозит активность взаимодействующих метаболических циклов метионина и цистеина, подавляя ключевые ферменты, регулирующие уровень цистеина, и повышая образование гомоцистеина. Пероксинитрит реагирует и с метаболитотропным трансммиттером CO<sub>2</sub>, образуя сильный нитрозилирующий агент — нитропероксикарбонат. Важным механизмом нейротоксического действия пероксинитрита является его реакция с тирозином и образование нитротирозина. Пероксинитрит значительно угнетает активность CuZnСОД и MnСОД посредством нитрования ее 34го тирозинового остатка, а также связывания с медью и изменения ее валентности. Пероксинитрит является специфическим агентом, необратимо угнетающим митохондриальное дыхание при ишемии, непосредственно вза-



имодействуя с железом активных центров ключевых энзимов, а также нитрозируя по S, N, O-элементам тиольные, фенольные, гидроксильные и аминокислотные группы белковой части этих энзимов, а при более выраженном проявлении нитрозирующего стресса необратимо окисляя их. Подавление митохондриального дыхания приводит к снижению заряда митохондрий, что может инициировать апоптотический процесс, а при отсутствии глюкозы — некроз. Имеются данные и о прямой активации открытия гигантской поры оксидом азота, приводящей к выходу цитохрома C и запуску каспазного каскада. Эти данные получены при воздействии на митохондрии таких цитотоксических дериватов NO, как пероксинитрит и ион нитрозония, в механизме которых лежит модификация тиольных белков митохондриальной поры. NO и его дериваты могут вызывать перекисное окисление фосфолипидов. Так, под действием цитотоксических дериватов NO и гидроксил-радикала происходит открытие митохондриальных пор, экспрессией и выходом в цитозоль проапоптотических белков. Открытие пор происходит за счет окисления или нитрозилирования тиольных групп цистеинзависимого участка белка внутренней мембраны митохондрий (АТФ/АДФ-антипортер), что превращает его в проницаемый неспецифический канал. Открытие пор превращает митохондрии из «электростанций» в «топку» субстратов окисления без образования АТФ. Кроме того, поврежденные митохондрии превращаются в источник АФК и проапоптотических факторов.

Назначение животным с ЭАЭ метилпреднизолона не оказывало достоверного влияния на изучаемые показатели энергетического обмена и митохондриальной дисфункции (табл 1–3). Комплексное введение метилпреднизолона и цитиколина оказывало достоверное влияние на некоторые показатели дисфункции митохондрий и энергетического обмена головного мозга. Так, введение этой комбинации приводило к достоверному снижению скорости открытия митохондриальной поры на 66% и повышению заряда внутренней мембраны митохондрии на 69%.

Таблица 1

**Показатели дисфункции митохондрий головного мозга при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите**

Группа животных	открытие митохондриальной поры, $\Delta E$ (540нм)	потенциал мембраны митохондрии (сафранин-О)
интакт	$0,019 \pm 0,001$	$50,9 \pm 2,05$
Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ)	$0,193 \pm 0,013$ (+915%)	$10,9 \pm 1,21$ (-78%)
ЭАЭ + метилпреднизолон	$0,186 \pm 0,015$	$13,0 \pm 1,21$
ЭАЭ + метилпреднизолон+ цитиколин	$0,065 \pm 0,005^*$ (-66%)	$18,5 \pm 1,8^*$ (+69%)

Таблица 2

**Адениловые нуклеотиды в головном мозге животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелиитом**

Группа животных	АТФ, мкмоль/ г ткани	АДФ, мкмоль/ г ткани	АМФ, мкмоль/ г ткани
Интакт	2,80 ± 0,15	0,27 ± 0,013	0,114 ± 0,008
ЭАЭ	1,60 ± 0,08 (-42%)	0,153 ± 0,010 (-43%)	0,208 ± 0,021 (+82%)
ЭАЭ+ метилпреднизолон	1,67 ± 0,13	0,148 ± 0,025	0,202 ± 0,016
ЭАЭ+ метилпреднизолон+ цитиколин	1,81 ± 0,11* (+13%)	0,178 ± 0,011* (+16%)	0,166 ± 0,011 (-20%)

Таблица 3

**Показатели энергетического обмена в головном мозге животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелиитом**

Группа животных	Лактат, мкмоль/ г ткани	Малат, мкмоль/ г ткани	Пируват, мкмоль/ г ткани	Изоцитрат, мкмоль/ г ткани	Аспаргат, мкмоль/ г ткани
Интакт	2,41 ± 0,09	0,45 ± 0,02	0,498 ± 0,026	0,288 ± 0,018	11,7 ± 0,80
ЭАЭ	4,86 ± 0,20 (+101%)	0,22 ± 0,03 (-51%)	0,25 ± 0,026 (-49%)	0,158 ± 0,010 (-45%)	6,95 ± 0,64 (-40%)
ЭАЭ+ метилпреднизолон	4,87 ± 0,21 (+0,2%)	0,24 ± 0,04 (+9%)	0,246 ± 0,050 (-1,6%)	0,164 ± 0,030 (+4%)	7,60 ± 0,50 (+9%)
ЭАЭ+ метилпреднизолон+ цитиколин	3,52 ± 0,31* (-27%)	0,34 ± 0,05 (+54%)	0,338 ± 0,030* (+35%)	0,286 ± 0,018* (+81%)	8,00 ± 0,66 (+15%)

Вследствие нормализации функциональной активности митохондрий головного мозга животных с ЭАЭ под действием комбинации метилпреднизолона и цитиколина происходит достоверное повышение уровней АТФ на 15% и АДФ на 16%, а также снижение лактата на 27% и повышение пирувата и изоцитрата на 35% и 81%. Содержание малата и аспартата в группе, получавшей метилпреднизолон и цитиколин достоверно не менялось. Можно сделать вывод, что комбинация метилпреднизолона и цитиколина ограничивает активность малопродуктивного анаэробного гликолиза и повышает аэробные реакции синтеза АТФ за счет активации окисления в цикле Кребса на трикарбонном участке (повышение изоцитрата). При этом комбинация цитиколина и метилпреднизолона не влияет на активность малат-аспартаного шунта в условиях ЭАЭ.

**Показатели энергетического обмена в головном мозге животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелиитом**

Группа животных	КФК, МЕ/л	ВВ-КФК, МЕ/л
Интакт	13,4 ± 1,2	6,82 ± 0,28
ЭАЭ	33,8 ± 2,16 (+152%)	11,7 ± 1,09 (+72%)
ЭАЭ+ метилпреднизолон	30,1 ± 3,0 (-11%)	10,7 ± 0,59 (-8%)
ЭАЭ+ метилпреднизолон+ цитиколин	20,8 ± 1,3* (-38%)	8,46 ± 0,81* (-27%)

Моделирование ЭАЭ приводит к повреждению нейронов головного мозга о чем свидетельствует повышение активности общей КФК на 152 % и ВВ-КФК на 72% в сыворотке крови экспериментальных животных. Введение животным с ЭАЭ метилпреднизолона не влияло на показатели активности КФК и ВВ-КФК. Введение метилпреднизолона совместно с цитиколином приводило к снижению общей КФК на 38% и ВВ-КФК на 27%, что свидетельствует об уменьшении нейродегенеративных процессов.

Моделирование ЭАЭ приводит к повреждению нейронов сенсомоторной зоны коры головного мозга экспериментальных животных. Так, в группе нелеченных животных с ЭАЭ наблюдалось уменьшение плотности нейроцитов на 19%, что свидетельствовало о гибели клеток, повышение их площади на 10%, свидетельствовало об отеке. Также было установлено снижение транскрипционных процессов в нейронах сенсомоторной коры при моделировании ЭАЭ, о чем свидетельствовало снижение РНК на 21%. Моделирование ЭАЭ приводило к активации нейроапоптоза. Так, в сенсомоторной зоне коры животных с ЭАЭ обнаружено повышение плотности апоптических и деструктивных клеток на 150%. Доля апоптических клеток в этой структуре головного мозга у животных с ЭАЭ выросла с 3,4% до 15, 7%, т.е практически в 5 раз. Назначение животным с ЭАЭ метилпреднизолона приводило к достоверному повышению плотности нейронов сенсомоторной коры на 3% и уменьшению их площади на 8%, что свидетельствовало о прямом нейропротективном эффекте гормональной терапии. Однако назначение метилпреднизолона в монотерапии не влияло на функциональные характеристики нейронов (уровень РНК не менялся) и не влияло на показатели нейроапоптоза. Назначение животным с ЭАЭ комбинированной терапии метилпреднизолона и цитиколина повысила эффективность нейропротекции [21–23]. У животных с ЭАЭ получавших комбинацию метилпреднизолона и цитиколина плотность нейронов повысилась на 9,4%, их площадь достигла значений интактных животных, концентрация РНК повысилась на 8,7%. Комбинация метилпреднизолона и цитиколина тормозила нейроапоптознейронов сенсомоторной коры в условиях ЭАЭ. Так, плотность апоптических и деструктивных клеток

Таблица 5

**Морфо-функциональные показатели нейронов сенсомоторной зоны коры головного мозга животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом**

Группа животных	Плотность нейронов (нейрон/мм <sup>2</sup> )	Площадь нейронов (мкм <sup>2</sup> )	Содержание РНК (E <sub>opt</sub> )
Интакт	1250,2 ± 25,5	83,0 ± 3,86	9,52 ± 0,33
ЭАЭ	1006,7 ± 10,7 (-19%)	91,5 ± 3,93 (+10%)	7,45 ± 0,62 (-21%)
ЭАЭ+ метилпреднизолон	1037,4 ± 6,8* (+3%)	84,2 ± 2,73* (-8%)	7,33 ± 0,44 (-2%)
ЭАЭ+ метилпреднизолон+ цитиколин	1101,4 ± 7,4* (+9,4%)	84,2 ± 2,11* (-8%)	8,10 ± 0,42 +8,7%

Таблица 6

**Показатели апоптоза нейронов сенсомоторной зоны коры головного мозга животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом**

Группа животных	Плотность апоптических и деструктивных клеток на 1 мм <sup>2</sup>	Доля апоптических клеток, %
Интакт	59,4 ± 6,89	3,4 ± 0,96
ЭАЭ	148,0 ± 16,4 (+149%)	15,7 ± 1,7 (+361%)
ЭАЭ+ метилпреднизолон	141,6 ± 11,0 (-4%)	15,0 ± 1,0 (-4%)
ЭАЭ+ метилпреднизолон+ цитиколин	119,2 ± 9,68* (-19,5%)	9,0 ± 1,0* (-42%)

уменьшилась на 19,5%, а доля апоптических клеток снизилась с 15,7% в контроле до 9% в группе, получавшей метилпреднизолон с цитиколином.

Цитиколин (церексон) не проявляет прямого энерготропного действия. У препарата имеется выраженный митопротективный эффект. Как показано в работах И. Ф. Беленичева и сотр. [24] Цераксон может сохранять целостность внутренней мембраны митохондрии, о чем свидетельствует восстановление ее потенциала. Подобный механизм связан с восстанавливанием уровня кардиолипина во внутренней мембране митохондрий. Кроме этого выявлено, что Цераксон, опосредовано, через увеличения активности глутатион-связанных ферментов (глутатинредуктаза и глутатиотрансфераза) регулирует уровень восстановленного глутатиона. Восстановленный глутатион, особенно митохондриальный, тормозит окислительную деструкцию Red-Oxi — чувствительных участков митохондриальной мембраны и формирование стойкой митохондриальной дисфункции [25]. Также в работах И. Ф. Беленичева показано, что через повышение уровня восстановленного глутатиона, цераксон может снижать реакции нитрози-

рующего стресса и тормозить NO-зависимые механизмы нейроапоптоза. Сохранность восстановленных эквивалентов глутатиона способствует ограничению цитотоксических эффектов NO и предотвращает накопление нитротирозина. С уровнем NO связан баланс про- и антиапоптотических механизмов при нитрозирующем стрессе. В условиях избытка АФК (в первую очередь пероксинитрита и гидроксилрадикала) окислительной модификации подвергаются антиапоптотические белки (bcl-2 и другие), а избыток NO-радикала на фоне повышенной активности iNOS усиливает синтез проапоптотических белков (FAS и APO-1) при нейродегенеративных патологиях. При нейродегенерации, в т.ч. ЭАЭ усиливается экспрессия провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF- $\alpha$ , HIF-1) и факторов, приводящих к транскрипции NF- $\kappa$ B, AP-1, JNK, которые опосредованно, в частности, через активацию iNOS, еще больше усиливают образование цитотоксических дериватов NO, приводящих к усилению молекулярных реакций митохондриальной дисфункции и нейроапоптоза. Усиление нейропротективного эффекта совместного введения метилпреднизолона с церексоном можно объяснить через призму NO-зависимых механизмов нейроапоптоза и митохондриальной дисфункции [26, 27]. По всей видимости, эффекты Церексона и метилпреднизолона при ЭАЭ сфокусированы на совместное подавление экспрессии и активности iNOS. Известны работы, где описаны эффекты метилпреднизолона по угнетению активности iNOS.

#### References:

1. Korkina M. V. Mental disorders in multiple sclerosis / M. V. Korkina, YU. S. Martynov, G. F. Malkov. — M.: UND, 1986. — 100 s.
2. Gusev E. I. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases / E. I. Gusev, I. A. Zavalishin, A. N. Bojko. — M.: Miklosh, 2004. — 540 s.
3. Alekseeva T. G. The range of neuropsychological changes in multiple sclerosis / T. G. Alekseeva, A. N. Bojko, E. I. Gusev // ZHurn. nevrolog. psikiatr. im. S. S. Korsakova. — 2000. — №11. — S. 15–20.
4. An integrated approach to the assessment of cognitive and emotional-personal sphere in multiple sclerosis patients / T. G. Alekseeva, E. V. Enikolopova, E. V. Sadal'skaya [i dr.] // ZHurn. nevrolog. psikiatr. im. S. S. Korsakova, special'nyj vypusk «Rasseyannyj skleroz». — 2002. — S. 20–26.
5. Executive function in multiple sclerosis. The role of frontal lobe pathology / J. Foong, L. Rozewicz, G. Quaghebeur [et al.] // Brain. — 1997. — Vol. 120 (Pt. 1). P. 15–26.
6. Multiple sclerosis — candidate mechanisms underlying CNS atrophy. / V. Siffrin, J. Vogt, H. Radbruch [et al.] // Trends. Neurosci. — 2010. — Vol. 33(4). P. 202–210.
7. Giuliani F. Immune-mediated neurodegeneration and neuroprotection in MS / F. Giuliani, V. W. Yong // Int. MS. J. — 2003. — N10. — P. 122–130.
8. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. / G. C. DeLuca, K. Williams, N. Evangelou [et al.] // Brain. — 2006. — Vol. 129 (Pt 6). — P. 391–399.

9. Myers L. W. Immunologic therapy for secondary and primary progressive multiple sclerosis / L. W. Myers // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* — 2001. — Vol. 1(3). — P. 286–293.
10. Lassmann H. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. / H. Lassmann, W. Bruck, C. F. Lucchinetti // *Brain. Pathol.* — 2007. — Vol. 17(2). — P. 210–218.
11. Multiple Sclerosis: A Guide for Physicians / T. E. Schmidt, N. N. Yahno. — 2-e izd. — M.: MEDpress–inform, 2010. — 272 s.
12. New technology predictions of therapy for multiple sclerosis / V. I. Golovkin, A. V. Pozdnyakov, YU. F. Kamynin, Martens // *Byulleten' sibirskoj mediciny.* — 2010. — №4. — S. 138 — 144.
13. Bruck W. Clinical implication of neuropathological findings in multiple sclerosis / W. Bruck // *J. Neurol.* — 2005. — Vol. 252 (Suppl. 3). — P. 10–14.
14. Dhib–Jalbut S. Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis / S. Dhib–Jalbut // *Neurology.* — 2007. — Vol. 29. — P. 13–21.
15. Nefedov A. A. Multiple sclerosis: pathogenetic mechanisms of development and peculiarities of the experiment / A. A. Nefedov, V. Mamchur, S. M. Dronov // *Proceedings of the Third International Scientific Conference "Economic Development: Theory, methodology, management"*, 9/1 November 2015 — Budapesht-Prague-Kyiv, 2015. — P. 159–166.
16. Lassmann H. Recent neuropathological findings in MS — implication for diagnosis and therapy / H. Lassmann // *J. Neurol.* — 2004. — Vol. 251. P. 2–5.
17. Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions. / J. W. Prineas, R. O. Barnard, T. Revesz, [et al.] // *Brain.* — 1993. — Vol. 116 ( Pt 3). — P. 681–693.
18. Raine C. S. Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions. / C. S. Raine, E. Wu // *J. Neuropathol Exp. Neurol.* — 1993. — Vol. 52(3). — P. 199–204.
19. Nefodov O. O. The role of immunotherapy in patients with multiple sclerosis in the practice of family doctor / O. O. Nefodov, V. J. Mamchur, O. I. Korsuns'ka // *Visnik problem biologii i medicini.* — 2014. — vip. 4, T. 1 (113). — S. 25–30.
20. Nefodov O. O. Modeling and assessment course of experimental allergic encephalomyelitis / O. O. Nefodov, V. J. Mamchur, YU. V. Harchenko // *Visnik problem biologii i medicini.* — 2014. — vip.4, T. 2 (114). — S. 205–208.
21. Nefedov A. A. Experience in the use of citicoline in the experimental allergic encephalomyelitis simulated therapy / A. A. Nefedov, V. I. Mamchur // *Visnik problem biologii i medicini.* — 2015. — Vip. 2, T. 4 (121). — S. 165–170.
22. Nefedov A. A. The possibilities of pharmacological correction of cognitive disorders in experimental equivalent of multiple sclerosis / A. A. Nefedov, V. I. Mamchur // *Medichni perspektivi.* — 2015. — T. HKH, №2. — S. 4–11.
23. Nefodov O. O. The use of citicoline as a way to improve the efficiency of the basic hormonal therapy for multiple sclerosis (experimental research): informatsiynny lyst. — Vyp. 8 z problemy «Farmakolohiya» / O. O. Nefodov, V. Y. Mamchur. — K. : Ukrmedpatentinform, 2015. — 4 s.

24. Belenichev I. F. Neuroprotection and neuroplasticity / I. F. Belenichev, V. I. CHernij, E. A. Nagorna, S. V. Pavlov, N. V. Buhtiyarova. — K.: Logos, 2015. — 512 c.

25. Belenichev I. F. IL-1Ra stabilises the thiol–disulfide system in the brain tissues of rats with experimental diabetes and cerebral ischemia / I. F. Belenichev, E. V. Suprun, L. A. Gromov // *European Neuropsychopharmacology*. — 2014. — Vol. 24, №2. — S. 236–239.

26. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of methylprednisolone effects on iNOS mRNA expression and nitric oxide during LPS-induced inflammation in rats / S. Sukumaran, E. I. Lepist, D. C. DuBois [et al.] // *Pharm. Res.* — 2012. — Vol. 29, №8. — P. 2060–2209.

27. Belenichev I. F. The Thiol–Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs / I. F. Belenichev, N. V. Bukhtiyarova // *Neurochemical Journal*. — 2014. — Vol. 8, N1. — P. 24–27.

28. Pre-clinical study of specific activity of potential drugs of primary and secondary neuroprotection / CHekman I. S., Belenichev I. F., Buhtiyarova N. V., Nagornaya E. A., Gorchakova N. A., Gorbacheva S. V. // *Metodicheskie rekomendacii GP «Gosudarstvennyj ehkspertnyj centr MZ Ukrainy»*. — 2016. — 80 s.