

©Коллектив авторов

## ПЕПТИДНЫЙ ПРЕПАРАТ КОРТЕКСИН ИНГИБИРУЕТ КАСПАЗУ-8 МОЗГА

А.А. Яковлев<sup>1,2\*</sup>, А.А. Лыжин<sup>3</sup>, Л.Г. Хаспеков<sup>3</sup>, А.Б. Гехт<sup>2,4</sup>, Н.В. Гуляева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии,  
117485, Москва, ул. Бутлерова, 5А; эл. почта: al\_yakovlev@rambler.ru

<sup>2</sup>Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева,  
115419, Москва, ул. Донская, 43

<sup>3</sup>Отдел исследований мозга Научного центра неврологии,  
105064, Москва, пер. Обуха, д. 5

<sup>4</sup>Кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики РНИМУ им. Н.И. Пирогова,  
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Пептидный препарат кортексин давно используется в клинике, однако механизмы действия этого препарата остаются недостаточно исследованными. Это делает актуальным изучение молекулярных механизмов влияния кортексина на функционирование мозга и, прежде всего, поиск первичных молекулярных мишеней. Мы предположили, что нейропротекторное действие кортексина связано с его способностью ингибировать протеазы, принимающие участие в гибели клеток мозга. В результате проведенных экспериментов установлено, что кортексин способен эффективно ингибировать каспазу-8 мозга. Кроме каспазы-8 были исследованы другие протеазы, каспазы-1, -3 и -9, катепсин В и кальпаин, но они ингибируются кортексином менее эффективно, либо не ингибируются совсем. Из кортексина была выделена фракция водорастворимых пептидов, обладающая всеми ингибирующими протеазы свойствами исходного кортексина, но значительно более простая по составу. Как кортексин, так и выделенная из него пептидная фракция способны в экспериментах *in vitro* предотвращать индуцированную глутаматом гибель нейронов. Таким образом, нейропротекторное действие кортексина может быть опосредовано прямым ингибированием инициаторной каспазы-8 мозга.

**Ключевые слова:** головной мозг, протеазы, каспазы, пептиды, кортексин

DOI 10.18097/PBMC20176301027

## ВВЕДЕНИЕ

Органоспецифические препараты природного происхождения и, прежде всего, пептидные препараты, полученные из мозга животных, потенциально являются очень перспективными для использования при лечении нейропатологий различного генеза [1]. Таких препаратов немного и механизмы действия их малоизучены, что ограничивает их применение или приводит к тому, что они применяются без глубокого патогенетического обоснования. Принципиально важным является поиск первичных мишеней действия пептидов, определяющих их нейропротекторные эффекты. Среди потенциальных мишеней особое внимание привлекают протеазы в связи с их ключевой ролью в гибели клеток мозга при церебральных патологиях.

В экспериментах *in vitro* показано, что церебролизин, препарат, содержащий пептидный гидролизат из мозга свиньи, обратимо и конкурентно ингибирует активность кальпаина и в меньшей степени трипсина и папаина, что, по мнению авторов, может быть связано с наличием в составе церебролизина пептидов с активностью кальпастина [2]. В экспериментах, моделирующих нейропатологии *in vivo* и *in vitro*, было показано снижение экспрессии каспазы-3 под действием церебролизина, однако постановка экспериментов не позволяет однозначно интерпретировать полученные результаты как прямые эффекты препарата [3, 4].

Отечественный пептидный препарат из мозга животных кортексин широко используется в клинике и обладает нейропротекторными свойствами, поэтому строгое научное обоснование его применения является актуальной задачей. В настоящее время кортексин применяется в клинической практике для лечения острых и хронических заболеваний головного мозга. Так, при инсульте кортексин снижает летальность, препятствует увеличению объема очага инсульта и способствует улучшению клинического состояния пациентов [5]. Предполагается, что препарат повышает эффективность энергетического метаболизма нейронов, улучшает внутриклеточный синтез белка, регулирует процессы перекисного окисления и, вероятно, влияет на метаболизм нейромедиаторов [6], но конкретные прямые механизмы нейропротекторных эффектов кортексина и потенциальные первичные мишени составных частей этого сложного препарата остаются неисследованными. Внутриклеточная протеолитическая система каспаз является основной системой, опосредующей гибель нейронов в мозге как в норме, так и при патологии. В частности, при ишемии мозга экспрессия белка и мРНК каспазы-3, а также ферментативная активность каспазы-3 возрастают в поврежденных участках мозга, а ингибитор каспазы-3 существенно снижает гибель нейронов [7]. Ферментами, активирующими каспазу-3 в мозге, являются, в первую очередь, инициаторные каспазы: каспаза-8 и каспаза-9 [7]. Также в реализации

\* - адресат для переписки

программы гибели клеток могут принимать участие кислые лизосомальные ферменты катепсины [7] и кальций-зависимая протеаза кальпаин [10]. Перечисленные протеазы являются основными исполнителями программы гибели клеток мозга, и ингибирование этих протеаз является перспективной стратегией предотвращения гибели клеток при различных патологиях мозга.

Мы предположили, что механизмом действия нейропротекторного препарата кортексин может быть ингибирование протеаз. Для этого в системе *in vitro* мы проверили влияние кортексина на активность основных протеаз, принимающих участие в гибели клеток мозга. После того, как был обнаружен эффект ингибирования кортексином некоторых протеаз мозга, мы выделили из кортексина фракцию, которая обладает теми же ингибирующими свойствами, но является более простой по составу. Оказалось, что и сам кортексин, и его активная фракция не только способны ингибировать протеазы, но и предотвращают гибель нейронов в культуре в модели экзайтотоксического повреждения глутаматом.

## МЕТОДИКА

### *Разделение кортексина на фракции с использованием низкоэффективной обращённо-фазной хроматографии*

В работе был использован коммерчески доступный препарат кортексин производства компании “Герофарм”, Санкт-Петербург. Кортексин разводили до концентрации 50 мг/мл 2% ацетонитрилом (ACN) с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA). Раствор наносили на колонку 6 мл Phenomenex Strata C18-E, средний размер частиц 70 мкм, при атмосферном давлении. Всего на одну колонку наносили 100 мг вещества. Промывали колонку 6 мл 2% ACN с добавлением 0,1% TFA, затем последовательно элюировали 20%, 50% и 80% ACN с добавлением 0,1% TFA, также в объёме 6 мл. Все фракции, включая несвязавшуюся, полностью упаривали на концентраторе Eppendorf. Сухой осадок растворяли в воде, причём в таком же объёме, в каком был растворён исходный кортексин.

### *Работа с животными*

Все эксперименты на животных были одобрены этическим комитетом Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. В эксперименте были использованы 23 крысы линии Wistar возрастом 3-4 месяца весом 350-400 г. Животных декапитировали и на льду промывали мозг и отделяли его от сосудистых оболочек. Мозг (вес 1200-1500 мг) гомогенизировали в пятикратном объёме буфера 20 mM HEPES pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ЭДТА, 1 mM DTT. Полученный гомогенат центрифугировали 30 мин при 14000 g при 4°C. Супернатант отделяли от осадка и замораживали при -80°C. Определение концентрации белка проводили по методу Бредфорд. Все работы с биологическим материалом проводили на льду.

### *Культуры клеток*

Диссоциированные клетки-зерна мозжечка 7-дневных крыс линии Wistar культивировали по описанной ранее методике [11] в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 95% воздуха, 35,5°C) в течение 7 или 10 дней, в зависимости от задач эксперимента. Клеточную суспензию раскапывали по 150 мкл на лунку в 24-луночные планшеты, предварительно покрытые полиэтиленгликолем (0,5 мг/мл). В каждом эксперименте анализировали не менее 3 параллельных образцов сестринских культур. Всего было проведено 4 эксперимента, не менее 4 точек на группу.

### *Обработка клеток глутаматом*

В модели острой экзайтотоксичности клетки помещали в BSS (глюкоза 10 mM, NaCl 143,4 mM, KCl 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, HEPES 5 mM, pH 7,4), содержащий глутамат в концентрации 250 мкМ, на 15 или 30 мин. Далее клетки помещали в BSS на 5 ч в CO<sub>2</sub>-инкубатор, после чего отбирали пробы. Во всех экспериментах кортексин и активную фракцию кортексина добавляли за сутки до введения глутамата. Концентрация кортексина была подобрана исходя из данных предварительных экспериментов и составляла 100 мкг/мл. Активную фракцию кортексина разводили так, чтобы в пересчёте на кортексин концентрация составляла те же 100 мкг/мл. Клетки окрашивали с помощью пропидиум йодида.

### *Определение активности протеаз*

Активность каспазы-3 определяли флуориметрическим методом. Лизат (концентрация белка 1,0 мг/мл) инкубировали при 37°C в реакционном буфере (100 mM MES pH 7,5, 10 mM дитиотреитол, 1 mM ЭДТА) в двух параллельных образцах с добавлением 50 мкМ флуорогенного субстрата (N-ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-7-амино-4-метилкумарин, флуорогенный субстрат для каспазы-3, “Biomol”, США). Флуоресценцию регистрировали в течение 60 мин на планшетном ридере Wallac 3 (“Perkin Elmer”, США) при длинах волн возбуждения и эмиссии 380 нм и 440 нм соответственно. Активность других каспаз определяли аналогично, за исключением того, что для каждой каспазы был использован свой специфический субстрат в концентрации 50 мкМ: Ас-YVAD-АМС (N-ацетил-Тир-Вал-Ала-Асп-7-амино-4-метилкумарин) для каспазы-1, Ас-IETD-АМС (N-ацетил-Иле-Глу-Тре-Асп-7-амино-4-метилкумарин) для каспазы-8, Ас-VEHD-АМС (N-ацетил-Вал-Глу-Гис-Асп-7-амино-4-метилкумарин) для каспазы-9. Активность катепсина В определяли схожим образом, за исключением pH среды, который был равен 4,5. В качестве субстрата использовали 50 мкМ Z-RR-АМС (N-бензилоксикарбонил-Арг-Арг-7-амино-4-метилкумарин, “Biomol”) Активность кальпаина также определяли флуоресцентным методом. Лизат клеток смешивали с реакционной средой следующего состава: 63 mM имидазол-HCl, pH 7,4, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM дитиотреитол, 50 мкМ флуорогенный субстрат

кальпаина Ас-LY-AMC (N-ацетил-Лей-Тир-7-амино-4-метилкумарин, "Biomol"). В течение 60 мин инкубации при 37°C измеряли флуоресценцию при длинах волн возбуждения и эмиссии 380 и 440 нм соответственно. Кортексин или его фракцию растворяли в воде и смешивали с гомогенатом до достижения искомой концентрации непосредственно перед инкубацией. Активность протеаз рассчитывали по флуоресценции известных концентраций стандарта AMC и выражали в пмоль/мин/мг белка. Всего проведено 4 эксперимента с каждой протеазой.

#### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc. В каждой группе было не менее 3-х образцов. Достоверность различий между группами определяли при помощи теста Манна-Уитни. Графики строили в программе SigmaPlot, данные на графиках представлены в виде  $M \pm SD$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки возможного влияния кортексина на протеолитические ферменты мозга мы использовали простую систему *in vitro*. К гомогенату мозга крысы добавляли кортексин в разных концентрациях и определяли активность протеаз, играющих важную роль в реализации клеточной гибели. Кортексин был использован в концентрациях от 0,1 до 1000 мкг/мл. Влияние кортексина на важнейшие для реализации гибели клетки протеазы представлено в таблице. Каспаза-3 оказалась нечувствительна к кортексину во всех использованных концентрациях, так же как катепсин В и кальпаин.

Три перечисленные протеазы, по крайней мере, в головном мозге, являются основными исполнителями программы гибели [8-10]. Вне зависимости от исходного воздействия, приведшего клетку к гибели, процесс деградации основной массы клеточных белков происходит с участием именно этих ферментов: каспазы-3, катепсина В (и других катепсинов), кальпаина, или любого сочетания этих ферментов. Поскольку кортексин в существенной степени не ингибирует данные протеазы, можно предположить, что нейропротекторное действие препарата обусловлено влиянием на другие виды протеаз.

Однако программа клеточной гибели включает в себя не только исполнителей, но прежде всего, инициаторов, то есть те ферменты, которые запускают программу гибели. Мы не ограничились исследованием влияния кортексина на исполнительные ферменты и оценили влияние этого препарата на инициаторные ферменты, необходимые для запуска программы клеточной гибели в мозге. Результаты представлены в таблице. Кортексин не влияет на активность каспазы-1 в диапазоне концентраций кортексина от 1 до 1000 мкг/мл. В отличие от остальных ферментов, каспаза-8 оказалась весьма чувствительной к кортексину (таблица). Этот фермент ингибируется кортексином, так что  $IC_{50}$  составляет  $0,75 \pm 0,12$  мкг/мл.

На активность каспазы-9 кортексин не влияет. Таким образом, кортексин способен эффективно ингибировать каспазу-8, что может являться важным компонентом нейропротекторного действия препарата. Наиболее вероятно, что ингибирующим эффектом обладают пептиды кортексина в диапазоне молекулярных масс от двух до трёх кДа.

Таблица. Ингибирование протеолитических ферментов кортексином и его активной фракцией

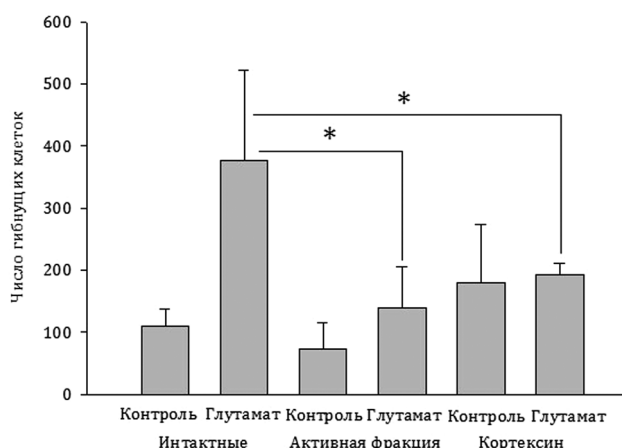
Фермент	$IC_{50}$ кортексина, мкг/мл	$IC_{50}$ активной фракции кортексина, мкг/мл
Каспаза-3	$>>1000$	$>>1000$
Катепсин В	$>>1000$	$>>1000$
Кальпаин	$>>1000$	$>>1000$
Каспаза-1	$>1000$	$>1000$
Каспаза-8	$0,75 \pm 0,12$	$3,74 \pm 1,14$
Каспаза-9	$>1000$	$>1000$

В предварительных экспериментах мы выяснили, что в состав кортексина входят пептиды массой примерно от 1,5 до 9 кДа (доп. рис. 1). Мы предположили, что большая часть из этих пептидов обеспечивает другие нейропротекторные свойства препарата, однако в задачи нашего исследования входило изучение влияния фракций кортексина на протеазы. С помощью обращённо-фазной хроматографии мы выделили фракцию, которая была проще по составу, и исследовали её влияние на протеазы (доп. рис. 2). В таблице концентрация активной фракции кортексина для удобства сравнения с исходным препаратом приведена в пересчёте на сам кортексин, то есть концентрация 100 мкг/мл активной фракции означает, что данное её количество получено из 100 мкг исходного кортексина и разведено в 1 мл.

Влияние активной фракции кортексина на важнейшие для реализации гибели клетки протеазы представлено в таблице. Каспаза-3 оказалась нечувствительна к действию фракции так же, как и самого кортексина, во всех использованных концентрациях, от 0,1 до 1000 мкг/мл, так же как катепсин В и кальпаин. Активная фракция кортексина не влияла на активность каспазы-1 и каспазы-9 при концентрации активной фракции кортексина от 0,1 до 1000 мкг/мл. Активность каспазы-8 сильно зависела от концентрации активной фракции кортексина (таблица). Концентрация полумаксимального ингибирования составила  $3,74 \pm 1,14$  мкг/мл. Таким образом, и на инициаторные каспазы, так же как и на исполнительные протеазы, активная фракция кортексина действует так же, как и сам кортексин (таблица). Наше исследование показало, что полученная с помощью хроматографии фракция воспроизводит важные свойства кортексина, в первую очередь, ингибирование каспазы-8, и при этом является более простой по составу.

Нейропротекторные свойства кортексина и его активной фракции были проверены на модели эксайтотоксического повреждения культивированных зернистых нейронов (КЗН) мозжечка. Клетки

в течение суток инкубировали с кортексином (100 мкг/мл) или его активной фракцией в соответствующей концентрации, после чего подвергали действию экзайтотоксической концентрации глутамата (250 мМ) и спустя 5 ч регистрировали гибель клеток в разных группах по включению пропидиум иодида. До воздействия глутамата число погибших клеток в контрольной группе, группе с активной фракцией кортексина и в группе с кортексином не отличались друг от друга (рисунок). Однако после воздействия глутамата число погибших клеток в контроле значительно превысило число клеток в группе “кортексин” и в группе “активная фракция кортексина” (рисунок,  $p < 0,05$  по тесту Манна-Уитни). Интересно, что в использованных нами условиях на модели глутаматной экзайтотоксичности нейропротекторные эффекты кортексина были наиболее выражены через сутки инкубации кортексина в культуре. Таким образом, кортексин и его активная фракция способны защищать нейроны от неблагоприятного воздействия глутамата. Более того, эффекты кортексина и его активной фракции очень схожи, при том, что фракция гораздо проще по составу. Возможно, препарат на основе активной фракции кортексина будет иметь такие же нейропротекторные свойства, как и сам кортексин, при этом будет проще по составу и, соответственно, проще в изготовлении.



**Рисунок.** Число погибших клеток через пять часов токсического действия глутамата в контроле и при инкубации клеток с кортексином или его активной фракцией. \* -  $p < 0,05$  по тесту Манна-Уитни.

Каспаза-8 является основной инициаторной каспазой для целого ряда сценариев клеточной гибели в организме. Одним из первых свидетельств вовлечения каспазы-8 в гибель нейронов были данные об её участии в нейродеструктивных процессах при моделировании болезни Хантингтона (БХ) [12]. На модели болезни Паркинсона (БП) и в мозге пациентов с этим заболеванием также найдена активная каспаза-8 и установлены чёткие механизмы её участия в гибели дофаминергических нейронов при БП [13]. Участие каспазы-8 установлено и при индуцированной бета-амилоидом гибели нервных клеток [14]. Ингибитор каспазы-8, так же, как и экспрессия доминантно негативного мутанта

белка партнера каспазы-8, предотвращает гибель клеток в модели болезни Альцгеймера (БА). Все три вышеупомянутых заболевания (БХ, БП и БА) можно объединить по одному важному принципу: при них происходит агрегация внутриклеточных белков. При агрегации белки теряют растворимость, ухудшают функционирование внутриклеточных систем, способствуют выработке внутриклеточных токсических медиаторов и постепенно приводят клетку к гибели. Именно в таких ситуациях активируется каспаза-8 [15]. Полученные нами результаты в определенной степени указывают на возможный нейропротекторный потенциал кортексина при хронических нейродегенеративных формах церебральной патологии. Более того, полученная нами активная в отношении каспазы-8 фракция кортексина может стать основой для нового препарата.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Кортексин является гидролизатом белков коры головного мозга животных и относится к группе препаратов, действующих на центральную нервную систему. В целом, этот препарат можно охарактеризовать как смесь водорастворимых пептидов размером примерно 20-60 аминокислот. Установлен ряд эффектов кортексина на центральную нервную систему, среди которых особенно важным является нейропротекторное действие [5, 6].

Мы выдвинули и проверили гипотезу о том, что эффект кортексина на клетки мозга опосредован его способностью модулировать активность протеолитических систем. Оказалось, что кортексин ингибирует протеазы головного мозга, причём степень ингибирования зависит от типа протеазы. Сильнее всего влияние кортексина выражено на активность каспазы-8 мозга. Как следует из результатов нашего исследования, ингибирующее влияние кортексина на каспазу-8 начинается уже от концентрации 0,1 мкг/мл. Ингибирование каспазы-3, кальпаина и катепсина В практически не происходит. Каспаза-1 и каспаза-9 ингибируются кортексином только при очень больших концентрациях, больше 1000 мкг/мл.

Рассматривая ингибирование каспазы-8, можно предполагать специфическое действие на неё по крайней мере какого-то одного из пептидов кортексина. Кроме того, анализ полученных результатов позволяет предполагать, что эффекты кортексина в значительной степени обусловлены ингибированием каспазы-8. Простой пересчёт используемой в клинической практике дозы кортексина в концентрацию пептидов в организме показывает, что пептиды кортексина в курсе лечения находятся в области ингибирующей каспазу-8 концентрации, 0,1 мкг/мл, и такая концентрация вполне может быть достижима *in vivo*.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выполнено при финансовой поддержке РФФИ, грант № 14-04-01858.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Умнов Р.С., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. (2013) Успехи геронтол., **26**, 671-678.
2. Wronski R., Tompa P., Hutter-Paier B., Crailsheim K., Friedrich P., Windisch M.J. (2000) Neural Transm (Vienna), **107**, 145-157.
3. Hartwig K., Fackler V., Jaksch-Bogensperger H., Winter S., Furtner T., Couillard-Despres S., Meier D., Moessler H., Aigner L. (2014) Int. J. Dev. Neurosci., **38**, 52-58.
4. Abdel-Salam O.M., Omara E.A., Mohammed N.A., Youness E.R., Khadrawy Y.A., Sleem A.A. (2013) Drug Discov. Ther., **7**, 261-271.
5. Скоромец А.А., Стаховская Л.В., Белкин А.А., Шеховцова К.В., Кербинов О.Б., Мешикова К.С., Буренчев Д.В., Гаврилова О.В., Скворцова В.И. (2007) в: Нейропротекция при острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения (Скоромец А.А., Дьяконов М.М., ред.). Наука, СПб, с. 7-16.
6. Гранстрем О.К., Сорокина Е.Г., Салькина М.А., Сторожевых Т.П., Сурин А.М., Штучная Г.В., Реутов В.П., Крушинский А.Л., Кузнецов В.С., Пинелис В.Г., Дьяконов М.М. (2010) Нейроиммунология, **8**, 34-40.
7. Chen J., Nagayama T., Jin K., Stetler R., Zhu R., Graham S., Simon R. (1998) J. Neurosci., **18**, 4914-4928.
8. Pop C., Salvesen G. (2009) J. Biol. Chem., **284**, 21777-21781.
9. Levine B., Kroemer G. (2008) Cell, **132**, 27-42.
10. Pinton P., Giorgi C., Siviéro R., Zecchini E., Rizzuto R. (2008) Oncogene, **27**, 6407-6418.
11. Andreeva N., Khodorov B., Stelmashook E., Cragoe E., Victorov I. (1991) Brain Res., **548**, 322-325.
12. Sanchez I., Xu C.J., Juo P., Kakizaka A., Blenis J., Yuan J. (1999) Neuron, **22**, 623-633.
13. Viswanath V., Wu Y., Boonplueang R., Chen S., Stevenson F.F., Yantiri F., Yang L., Beal M.F., Andersen J.K. (2001) J. Neurosci., **21**, 9519-9528.
14. Ivins K.J., Thornton P.L., Rohn T.T., Cotman C.W. (1999) Neurobiol. Dis., **6**, 440-449.
15. Nijhawan D., Honarpour N., Wang X. (2000) Annu. Rev. Neurosci., **23**, 73-87.

Поступила: 29. 07. 2016.  
Принята к печати: 27. 09. 2016.

## PEPTIDE DRUG CORTEXIN INHIBITS BRAIN CASPASE-8

A.A. Yakovlev<sup>1,2</sup>, A.A. Lyzhin<sup>3</sup>, L.G. Khaspekov<sup>3</sup>, A.B. Guekht<sup>2,4</sup>, N.V. Gulyaeva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology,  
117485, 5A Butlerova str., Moscow, Russia; e-mail: al\_yakovlev@rambler.ru

<sup>2</sup>Moscow Research & Clinical Center for Neuropsychiatry,  
115419, 43 Donskaya str., Moscow, Russia

<sup>3</sup>Research Center of Neurology, 105064, 5 Obukha lane, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Russian National Research Medical University, 117997, 1 Ostrovitianova str., Moscow, Russia

Cortexin, a drug containing hydrolyzed brain peptides, has long been used in clinics, but the mechanisms of its action remain obscure. We have hypothesized that cortexin-related neuroprotection is associated with the ability of the drug to inhibit brain proteases. Cortexin effectively inhibited brain caspase-8, while its effects on caspase-1, -3, -9, cathepsin B and calpain were much less pronounced or absent. In addition, we isolated a peptide fraction from cortexin holding all the inhibitory capacity of the original drug, but with a much more simple composition. Both cortexin and its fraction prevented neuronal damage in a culture model of glutamate-induced cell death. Neuroprotective effect of Cortexin may be mediated by inhibition of the initiator caspase-8 in the brain.

**Key words:** brain, proteases, caspases, peptides, cortexin