

*На правах рукописи*

**Шакова Фатимат Мухамедовна**

**МЕХАНИЗМЫ ДИЗРЕГУЛЯЦИИ  
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫХ СИСТЕМ  
ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА  
(экспериментальное исследование)**

3.3.3. Патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

**Москва – 2022**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

**Научный консультант:**

**Романова Галина Александровна** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

**Официальные оппоненты:**

**Реутов Валентин Палладиевич** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной нейроцитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

**Савин Алексей Алексеевич** – доктор медицинских наук, профессор кафедры нервных болезней лечебного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Гребенчиков Олег Александрович** – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией органопротекции при критических состояниях Научно-исследовательского института общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится «02» февраля 2023 г. в 12 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета 24.1.180.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте: <http://www.niiopp.ru/>

Автореферат разослан «15» декабря 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук



Н.Б. Панкова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Инсульт остается важнейшей медико-социальной проблемой, что обусловлено его высокой долей в структуре заболеваемости и смертности населения, значительными показателями временной утраты трудоспособности и первичной инвалидизации (Пирадов М.А. и др., 2019). В этих условиях разработка новых стратегий терапии инсульта остается глобальной задачей современной медицины. Эффективная нейропротекция – залог успеха лечения пациентов с острым инсультом, поэтому любые экспериментальные и клинические исследования новых лекарственных препаратов с возможным нейропротективным действием имеют высокую актуальность и востребованность (Танащян М.М., Домашенко М.А., 2016). Ранее накопленные научные данные позволили выявить основные механизмы повреждения ткани мозга при ишемии, многие из которых стали потенциальными мишенями для терапевтических тактик (Гусев И.Е., Скворцова В.И., 2001). Каскад патологических реакций при ишемии представляет собой сложный комплекс нейрохимических процессов, включающий в себя биоэнергетическую недостаточность, глутаматную эксайтотоксичность, окислительный стресс, дисфункцию гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), микрососудистые повреждения, гемостатическую активацию, постишемическую аутоиммунную реакцию, апоптоз и гибель нейронов, глиальных и эндотелиальных клеток (Brouns R., 2009). Современная нейропротекция направлена на ключевые звенья этого ишемического каскада. Несмотря на широкое изучение механизмов ишемического повреждения и попытки оптимизации фармакологических подходов к их коррекции, высокая заболеваемость инсультом и ее последствия остаются острой проблемой, которая требует разработки новых, более эффективных путей решения этой задачи. Необходимо подчеркнуть, что тяжесть ишемического поражения определяется не только активацией повреждающих программ, но, в значительной степени, функциональной несостоятельностью внутриклеточных нейропротективных систем. В настоящее время одним из малоизученных вопросов патогенеза инсульта является устойчивое снижение экспрессии ключевых защитных внутриклеточных систем, таких как антиоксидантные ферменты, факторы слияния митохондрий, противовоспалительные факторы (DelaVega M.C. et al., 2001; Petegnief V., 2008; Medvedeva E.V. et al., 2014). Изучение причин и механизмов устойчивого и прогрессирующего дисбаланса между повреждающими и защитными системами организма и поиск способов фармакологической коррекции открывает новые возможности для защиты нейрона в условиях ишемии.

## Степень разработанности темы

Многочисленные исследования патогенетических механизмов ишемического инсульта, выполненные в минувшем десятилетии, показали, что ведущая роль в развитии повреждения нейронов принадлежит митохондриальной дисфункции, а поддержание структурно-функциональной стабильности митохондрий является основой эффективной нейропротекции. По данным ряда авторов, ключевым регулятором митохондриогенеза, митохондриальной динамики, аэробного метаболизма и энергетического гомеостаза клеток является транскрипционный коактиватор PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ), открытый в 1998 году (Scarpulla R. C. et al., 2012; Ventura-Clapier R. et al., 2008). В настоящее время показано, что PGC-1 $\alpha$  осуществляет активацию свыше двух десятков транскрипционных факторов, причем вне ассоциации с ним эти факторы практически утрачивают свою активность. Наиболее значимыми транскрипционными факторами, определяющими механизмы выживания нейронов, являются - ядерный респираторный фактор NRF1/2 (nuclear respiratory factor), контролирующей экспрессию более 70% ферментов энергопродуцирующей системы митохондрий;  $\gamma$ -рецептор, активируемый пролифератором пероксисом PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor), который контролирует экспрессию митохондриальных ферментов окисления жирных кислот и противовоспалительных факторов;  $\alpha$ -рецептор, связанный с эстрогеном ERR $\alpha$  (estrogen-related receptor), активирующий экспрессию антиоксидантных ферментов, факторов слияния митохондрий и проангиогенных факторов; глюкокортикоидные рецепторы, запускающие экспрессию иммуносупрессорного цитокина - трансформирующего фактора роста TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) (Ventura-Clapier R. et al., 2008; Hong F. et al., 2019); белок Sp1 (stimulatory protein 1), который активирует экспрессию синаптофизина и синаптогенез (Cheng A. et al., 2012). PGC-1 $\alpha$  интегрирует сигналы эндогенных регуляторных молекул (глюкокортикоиды, тиреоидные гормоны, эстрогены, андрогены, липидные метаболиты, нейротрофины) и является важным координатором механизмов выживания клеток.

Ранее показано, что снижение экспрессии и активности PGC-1 $\alpha$  отмечается при нейродегенеративных заболеваниях. При этом, исследования динамики PGC-1 $\alpha$  при развитии острых нарушений мозгового кровообращения крайне малочисленны и противоречивы (Bouchez C. et al., 2019; Gibbs W.S. et al., 2016; Xie Y. et al., 2014; Yin W. et al., 2008). Отрывочны данные исследований динамики экспрессии/активности PGC-1 $\alpha$  в постишемическом периоде, а также зависимости тяжести молекулярно-клеточных и функциональных нарушений от активности PGC-1 $\alpha$  после ишемии. В связи с этим, представляет интерес изучение роли PGC-1 $\alpha$  в механизмах регуляции внутриклеточных нейропротективных систем при ишемическом инсульте и возможные пути ее коррекции.

**Цель исследования** – изучить механизмы нарушения регуляции внутриклеточных нейропротективных систем в условиях острой ишемии и выявить возможные пути их коррекции.

#### **Задачи исследования:**

1. Проанализировать влияние препаратов с нейропротективной активностью на динамику нейрохимических и морфофункциональных нарушений при остром ишемическом инсульте.
2. Оценить уровень экспрессии PGC-1 $\alpha$  в перифокальной зоне префронтальной коры в раннем постишемическом периоде (с 1-го по 21 сутки).
3. Определить уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$ .
4. Оценить внутриклеточную локализацию PGC-1 $\alpha$  в нейронах перифокальной зоны префронтальной коры в остром постишемическом периоде.
5. Изучить динамику протяженности и клеточного состава перинфарктной зоны в раннем постишемическом периоде.
6. Оценить PGC-1 $\alpha$ -модулирующую активность аналогов нейропептидов и непептидных соединений, реализующих рецептор-опосредованные защитные эффекты на экспрессию, внутриклеточную локализацию и активность PGC-1 $\alpha$  в перинфарктной зоне коры головного мозга.

#### **Научная новизна исследования**

В развитии ишемического инсульта впервые выявлен интегральный триггерный механизм дизрегуляции внутриклеточных нейропротективных систем – устойчивое снижение уровня и деактивация транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  – ключевого координатора биогенеза митохондрий и митохондриальной динамики, антиоксидантных систем, ангио- и синаптогенеза, противовоспалительной трансформации иммунцитов.

В исследовании впервые выполнен сравнительный анализ влияния препаратов сигнального действия пептидной и непептидной природы, с экспериментально и клинически подтвержденной нейропротективной активностью, на экспрессию и активность PGC-1 $\alpha$  в раннем постишемическом периоде. Впервые показано, что нейропротективные эффекты 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината и пептида-миметика АКТГ<sub>4-7</sub> (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) – препаратов, относящихся к разным фармакологическим группам, реализуются через механизм индукции и активации транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ , проявляющего плеiotорное потенцирующее влияние на выживаемость и функциональную активность нейронов.

#### **Научно-практическая значимость работы**

Результаты исследования позволяют рассматривать PGC-1 $\alpha$  как информативный молекулярно-клеточный маркер тяжести ишемического поражения мозга и эффективности применяемой нейропротекторной терапии.

Определение экспрессии и активности PGC-1 $\alpha$  может быть рекомендовано как обязательные критерии оценки эффективности в доклинических исследованиях фармакологических препаратов с потенциальной нейропротекторной активностью. Для оценки активности PGC-1 $\alpha$  наиболее специфичным подходом является определение экспрессии PGC-1 $\alpha$ -зависимых белков-маркеров митохондриогенеза: транскрипционных факторов TFAM, NRF1, каталитических субъединиц субстратного участка дыхательной цепи NDUFV2, SDHA.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Ишемический инсульт приводит к снижению уровня транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  - ключевого регулятора процессов биогенеза митохондрий, ангио- и синаптогенеза в коре головного мозга в раннем постишемическом периоде.
2. Уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$  повышается в первые сутки после ишемии и снижается в более поздние сроки (3-21-е сутки), что указывает на кратковременную активацию PGC-1 $\alpha$  в острейшем периоде инсульта с дальнейшим стойким снижением активности транскрипционного активатора.
3. Массивная инфильтрация перифокальной зоны лейкоцитами крови, нарастающие микроциркуляторные нарушения и прогрессия области ишемического поражения свидетельствуют о развитии острой воспалительной реакции и дисфункции PGC-1 $\alpha$ , контролирующего механизмы противовоспалительной поляризации иммуноцитов в области очага.
4. Стимуляция экспрессии и активности PGC-1 $\alpha$  путем рецептор-опосредованной сукцинатной и АКТГ- сигнализации сопровождается активацией процессов митохондрио-, ангио-, синаптогенеза и торможением воспалительной реакции.
5. Применение в постишемическом периоде соединений пептидной и непептидной природы показало высокий потенциал в стимуляции экспрессии и активности PGC-1 $\alpha$  и коррекции метаболических нарушений, наиболее выраженный у сукцинатсодержащего препарата.

#### **Личный вклад автора в проведенное исследование**

Автором, совместно с научным консультантом, разработана концепция исследования, самостоятельно проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, сформулирована цель и задачи исследования, выполнен выбор методов исследования и схемы экспериментов. Моделирование ишемического инсульта, все ключевые эксперименты, а также анализ полученных результатов выполнены автором лично. Комплекс биохимических исследований (вестерн-блот анализ, иммуногистохимический анализ) осуществлялся автором совместно с д.б.н., гл.н.с. лаборатории общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП Кировой Ю.И. Часть вошедших в диссертационную работу данных

получена в соавторстве с другими исследователями, вклад которых отражен в публикациях по теме диссертации. Автором самостоятельно выполнены статистический анализ и интерпретация полученных результатов, сформулированы научная новизна, выводы и практические рекомендации. Автору принадлежит ведущая роль в написании научных публикаций по теме диссертации. Результаты представлены лично автором в докладах на российских и международных конференциях.

### **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методов исследования и статистического анализа экспериментального материала. Исследование выполнено с одобрения и под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП». Выводы полностью отражают полученные результаты.

### **Апробация результатов исследования**

Результаты работы были доложены автором и обсуждены на следующих конгрессах и конференциях: European College of Neuropsychopharmacology (ECNP, Берлин, Германия, 18-21 сентября 2014), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 17-20 марта 2015), European Behavioural Pharmacology Society Meeting (Верона, Италия, 12-15 сентября 2015), XI Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, 2-12 июня 2015; 3-13 июня 2020), International Stroke Conference 2020 (Лос-Анжелес, Калифорния, 19–21 февраля 2020), II Международной научно-практической конференции «Фундаментальная наука для практической медицины – 2021» (с. Эльбрус, КБР, 16 сентября 2021).

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 38 научных работ, отражающих основное содержание исследований, из них 22 статьи на русском и английском языках в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты диссертаций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы экспериментальных исследований, результаты исследования, обсуждение, выводы, список сокращений и список используемой литературы. Диссертационная работа изложена на 225 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 таблицами и 30 рисунками. В список литературы включено 341 работа: 53 отечественных и 288 зарубежных источника.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Все эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах, весом 200-220 грамм, выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» при естественном чередовании суточной освещенности, свободном доступе к пище и воде. Содержание лабораторных животных и проведение экспериментов было выполнено в соответствии с правилами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте, и требованиями Директивы Совета ЕС «О сближении законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (86/609/ЕЕС), национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и протоколом Этического комитета ФГБНУ НИИОПП.

*В первой серии экспериментов* оценивали нейрохимические и морфофункциональные нарушения при экспериментальном ишемическом повреждении коры головного мозга и анализ действия препаратов с нейропротективной активностью в этих условиях.

*Во второй серии экспериментов* изучали влияние ишемии на уровень транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  - ключевого регулятора митохондриогенеза, митохондриальной динамики, аэробного метаболизма и энергетического гомеостаза клеток и на уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$  в перинфарктной зоне префронтальной коры головного мозга, а также оценивали потенциальную PGC-1 $\alpha$ -модулирующую активность препаратов с нейропротективным действием из разных фармакологических групп.

### **Экспериментальная модель ишемического инсульта - фотохимический тромбоз сосудов головного мозга крысы**

Двустороннее фокальное ишемическое повреждение префронтальной коры головного мозга крыс поля Fr1 и Fr2 по стереотаксическому атласу (Paxinos G., Watson C., 1997), создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза (Watson C., 1985). Перед операцией наркотизированным животным вводили внутривенно в яремную вену (v.jugularis) 3% раствор фоточувствительного красителя бенгальского розового (Rose Bengal, Sigma-Aldrich St Louis) в дозе 40 мг/кг. Крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и отделяли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника света галогеновой лампы ( $\lambda=560\text{nm}$ ) мощностью 250W (25V), охлаждаемой вмонтированным в установку вентилятором, и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа, на 2 мм роstralнее брегмы и на 2 мм латеральнее сагиттального шва. Облучение проводили в течение 15 мин с каждой стороны (Романова Г.А. и др., 2001). Ложнооперированных животных подвергали тем же процедурам, за исключением введения бенгальского

розового. Фоточувствительный краситель при взаимодействии со светом длиной волны 560 нм выделяет свободный кислород, что ведет к адгезии и агрегации тромбоцитов, образованию тромбов и нарушению локального кровотока. Контрольные измерения температуры животного проводились *per rectum*, температура тела животного колебалась от 36,8С° до 37,6С°. Постооперационная рана обрабатывалась 3% раствором перекиси водорода, послеоперационный шов обрабатывался 5% спиртовым раствором йода. Животные в течение 4-х часов после операции находились под наблюдением в экспериментальной комнате, затем помещались в виварий.

*Для оценки неврологического дефицита, вызванного ишемическим повреждением коры головного мозга крысы, использовали поведенческие тесты.*

### **Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)**

Для выработки УРПИ применялась прямоугольная камера размером 45x23x25 см с акриловыми непрозрачными стенками и электрифицированным металлическим полом. Камера разделена стенкой, имеющей квадратное отверстие 6x6 см, на два равных отсека. В первый день обучения крысу помещали в освещенный отсек (лампа мощностью 100Вт), обследовав который, она через некоторое время (латентный период (ЛП) до обучения) переходила в темный отсек, после чего дверь в этот отсек камеры закрывали и оставляли там крысу на 5 мин. Через 1 ч процедуру повторяли и крысу сразу извлекали из темного отсека. На следующий день эту же процедуру повторяли дважды с часовым интервалом. При повторном заходе крысы в темный отсек камеры дверь в него закрывали и через металлические прутья пола пропускают электрический ток стандартизированной силы (1,3 мА, 50 Гц, 5 с), достаточный для выработки условного рефлекса, но не приводящий к другим поведенческим нарушениям. УРПИ считали выработанным, если ЛП при проверке рефлекса составлял не менее 300с. Животных с меньшим ЛП исключали из дальнейшего эксперимента (Буреш Я. и др., 1991).

### **Исследование двигательной активности и исследовательского поведения крыс в автоматизированном «открытом поле»**

Состояние ориентировочно-исследовательской активности животных изучали, помещая крысу на 5 минут в камеру электронно - оптического регистратора оценки движений РОДЕО-1 (МПО «Экран»; 46×46×19 см), где проводилась автоматическая цифровая оценка (количество пересечений световых лучей в закрытой камере) поведения подопытного животного - горизонтальной, вертикальной и исследовательской активности.

### **Водный лабиринт Морриса**

Для оценки формирования и определения прочности пространственной памяти использовался «Водный лабиринт Морриса». Тест основан на выработке у животных навыка нахождения лабиринте невидимой цели (платформы) по ориентирам (Morris R, 1984). Для регистрации движения животного в бассейне использовали цифровую

видеокамеру, которую устанавливали над центром бассейна. Камера фиксировала треки животного, производилась видеорегистрация траектории движения и компьютерный анализ данных.

### **Магнитно-резонансная томография**

Объем повреждения головного мозга экспериментальных животных прижизненно оценивали на магнитно-резонансном томографе BioSpec 70/30 USR фирмы Bruker (Germany) с постоянным магнитным полем 7Тл и с градиентной системой 105мТл/м. Морфометрический анализ МРТ изображений проводили в программе ImageJ 1.38x (National Institutes of Health, USA). Работа была выполнена в учебно-научном межфакультетском центре магнитной томографии и спектроскопии МГУ (Гуляев М.). Был использован стандартный протокол исследования мозга крысы. Общее время сканирования одного животного составляло около 25 мин.

### **Морфометрическая оценка объема ишемического повреждения**

Для морфометрического измерения площади очага серийного среза и объема ишемического повреждения использовали мозг экспериментальных животных, фиксированный методом погружения в смесь формалин-спирт-уксусная кислота (ФУС) в пропорции 2:7:1. После фиксации материал переносили на сутки в 70<sup>0</sup> спирт и резали на вибротоме 1000 (Tecnic Product international inc.) с шагом 100 мкм. Каждый второй срез последовательно монтировали на предметных стеклах, покрытых желатином, окрашивали 0,2% водным метиленовым синим. Далее препараты обрабатывались по стандартной гистологической методике: обезживали в спирте восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам. Гистологические препараты сканировали на слайдовой приставке сканера V100 PHOTO (Epson). Для определения площади ишемического повреждения использовали специализированную компьютерную программу Image J («Bethesda»).

### **Вестерн – блоттинг**

Для оценки уровня экспрессии PGC-1 $\alpha$  и PGC-1 $\alpha$ -зависимых белков использовался вестерн – блот анализ. Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology, Rockford, IL; USA) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems). О содержании искомым белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ) и в % к контролю.

### **Иммуногистохимический анализ**

Иммуногистохимическим методом определяли содержание и внутриклеточную локализацию PGC-1 $\alpha$  в парафиновых срезах префронтальной коры головного мозга крысы. Флуоресцентная микроскопия выполнялась на микроскопе Micromed 3 LUM (Ningbo Sheng Heng Optics & Electronics Co., Ltd; China). Для количественного анализа использовалась программа VideoTesT-Morphology 5.2 (LLC «VideoTesT»; Россия), при помощи которой определяли интегральную оптическую плотность клеток и общее

количество иммунореактивных клеток. На основании оценки интегральной оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 3 класса: клетки с высокой, средней и низкой иммунореактивностью (ИР).

### **Иммуноферментный анализ (ИФА)**

Методом ИФА проводится исследование содержания в сыворотке крови белка S100b у крыс с ишемическим повреждением головного мозга и влияния препаратов на его уровень при разных схемах лечения. Для исследования брали 2 мл крови из хвостовой вены животного. Для определения содержания S-100b белка в образцах сыворотки крови крыс использовали тест-систему “Rat soluble protein-100B (S-100B) ELISAKit”, согласно инструкции производителя. Анализ представляет собой высокочувствительный ИФА метод, диапазон обнаружения белка 3,12 пг/мл - 200 пг/мл. Концентрацию белка S100b в исследуемых образцах определяли с помощью калибровочной кривой, построенной по стандартам с известными концентрациями.

### **Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД)**

Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс (префронтальной коре, гиппокампе) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Pearson S.J., 1993) (ионпарная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette) с инжектором Rheodyne 7125. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом «внутреннего стандарта», исходя из отношений площадей пиков в стандартной смеси и в образце и выражали в нмоль/г ткани (Кудрин В.С.).

### **Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 7.0 (StatSoft. Inc., США). Статистические различия между данными, соответствующие нормальному распределению, были проанализированы, используя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Tukey для сопоставления трех и более групп. Статистические различия в данных, имеющих хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального, были проанализированы с использованием теста Крускала-Уоллиса с U-тестом Манна-Уитни. Критерием статистической значимости был уровень  $p < 0,05$ . Статистическую значимость различий объемов инфаркта оценивали по t-критерию Стьюдента.

### **Фармакологические препараты, использованные в исследовании**

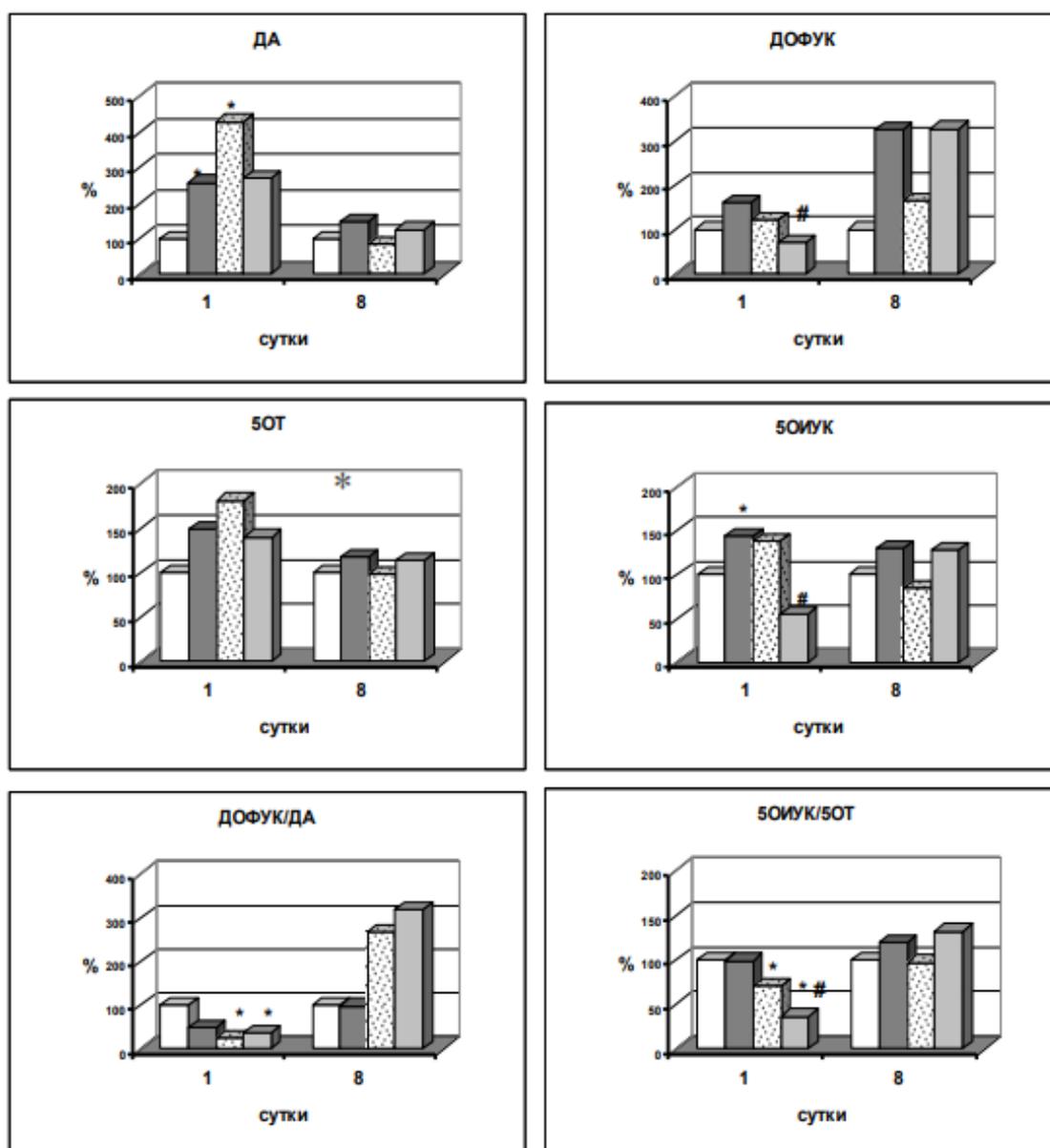
1. Антитела к глутамату (АТ-ГЛУ) получали от кроликов, иммунизированных по стандартной схеме конъюгатом глутамат бычий сывороточный альбумин (БСА), синтезированным модифицированным методом с помощью бифункционального реагента глутаральдегида (Ветрилэ Л.А, Давыдова Т.В., ФГБНУ НИИОПП). АТ-ГЛУ вводили интраназально животным в дозе 250 мкг/кг.

2. Дипептид ГК-2 (гексаметилендиамидбис-N-моносукцинилглутамиллизин), молекулярная масса 835 Да - дипептидный миметик четвертой петли фактора роста нервов (NGF), синтезирован в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (патент РФ - 2010 № 2410392). Исследовали влияние ГК-2 на объем ишемического поражения и компенсацию неврологического дефицита. ГК-2 вводили внутривнутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг.
3. Производные эритропоэтина (ЕРО). Методом генной инженерии в ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов созданы молекулы ЕРО, несущие замену (R103A), как в виде мономера ЕРО-TR, так и димера в форме рекомбинантного белка с Fc-фрагментом иммуноглобулина, сформированного за счёт димеризации двух Fc-фрагментов, с сильно редуцированной эритропоэтической обладают высокой цитопротективной активностью (модификации - ЕРО-TR, ЕРО-Fc, МЕРО-TR, МЕРО-Fc). Производные ЕРО вводились внутривнутрибрюшинно в дозе (50 мкг/кг) и интраназально (25 мкг/кг).
4. Синтетический аналог АКТГ. В Институте молекулярной генетики РАН синтезирован аналог фрагмента АКТГ - АКТГ<sub>4-7</sub> (торговое название «Семакс»), полностью лишенный гормональной активности, но обладающий нейропротекторными свойствами (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2005). Препарат вводился интраназально в дозе 25 мкг/кг.
5. 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат (действующее вещество – этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГП сукцинат, торговое название «Мексидол») синтезирован в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова. ЭМГП сукцинат применяли в качестве потенциального непептидного активатора PGC-1 $\alpha$ . Препарат вводился внутривнутрибрюшинно в дозе 20, 40, 100 мг/кг.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в структурах мозга крыс после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры**

Одним из главных механизмов при ишемических и травматических повреждениях мозга является нарушение глутаматергической нейротрансмиссии в головном мозге (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001; Романова Г.А., 2002). Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером в ЦНС, участвующим во многих процессах мозговой деятельности, включая когнитивные функции (Ашмарин И.П., Стукалов П.В., 1966; Kolb B., 1984). В данном разделе представлены результаты изучения влияния антител к глутамату (АТ-ГЛУ) на содержание моноаминов – дофамина и серотонина, ключевых нейротрансмиттеров, и их метаболитов в префронтальной коре и гиппокампе на 1-е и 8-е сутки после фототромбоза префронтальной области коры мозга крыс.

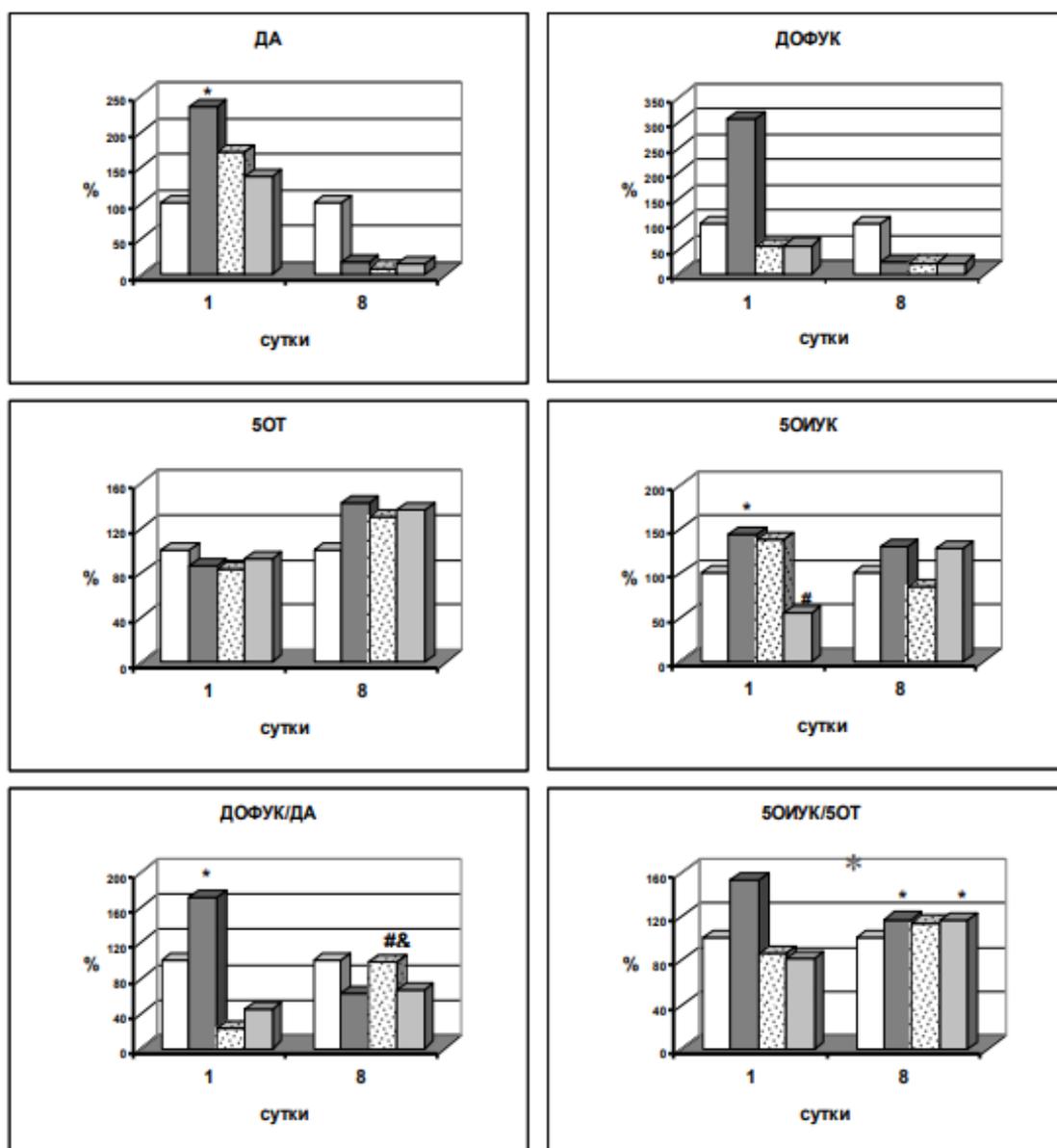


**Рисунок 1.** Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в префронтальной коре после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

По оси абсцисс обозначены сутки после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс. По оси ординат показано содержание моноаминов в префронтальной коре головного мозга крыс в процентах. Содержание моноаминов в контрольной группе ложнооперированных крыс принято за 100%. Белые столбики – ложнооперированные животные + NaCl 0,9%, темно-серые столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + NaCl 0,9%, заштрихованные столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + АТ-ГЛУ 250 мкг/кг, светло-серые столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + гамма-глобулин от интактных кроликов 250 мкг/кг. Примечание:  $p < 0,05$ ; \* - по сравнению с группой ложнооперированных крыс; # - по сравнению с группой крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры.

Исследование показало значительное повышение уровня дофамина (ДА) в префронтальной коре головного мозга в первые сутки после фототромбоза коры, как в группе, получавшей NaCl 0,9% ( $N = 24$ ) = 10,49 ( $P = 0,01$ ), так и при введении АТ-ГЛУ ( $N = 24$ ) = 12,66 ( $P = 0,0054$ ) (рис. 1). Однако, к 8-м суткам уровень дофамина во всех исследуемых группах животных снижался.оборот дофамина (3,4-

дигидроксифенилуксусная кислота/дофамин, ДОФУК/ДА) в первые сутки после фототромбоза снижался как в ишемизированной группе, так и в группах, получавших АТ-ГЛУ ( $N = 24$ ) = 9,01 ( $P = 0,029$ ) и  $\gamma$ -глобулин ( $N = 24$ ) = 12,80 ( $P = 0,0051$ ), а к 8-м суткам оборот дофамина имел тенденцию к увеличению в группе с введением АТ-ГЛУ и с введением  $\gamma$ -глобулина. Уровень серотонина (5-окситриптамин, 5-ОТ) в префронтальной коре в первые сутки после ишемии повышался во всех экспериментальных группах. Достоверно повышался уровень 5-оксииндолилуксусной кислоты (5-ОИУК) в ишемизированной группе и группе с введением АТ-ГЛУ. В группе с введением  $\gamma$ -глобулина в этот срок уровень 5-ОИУК был достоверно ниже, чем в ишемизированной группе. Уровень метаболита 5-ОИУК к восьмым суткам после ишемического повреждения оставался выше контроля в группе с ишемией без лечения и группе с введением гамма-глобулина. Оборот серотонина (5ОИУК/50Т) в первые сутки снижался в группах, получавших АТ-ГЛУ и гамма-глобулин. На 8-е сутки показатели уровня серотонина (5-ОТ) и его оборота (5ОУ/50Т) во всех исследуемых группах не отличался от контроля.



**Рисунок 2.** Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в гиппокампе после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

По оси абсцисс обозначены сутки после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс. По оси ординат показано содержание моноаминов в гиппокампе головного мозга крыс в процентах. Содержание моноаминов в контрольной группе ложнооперированных крыс принято за 100%. Белые столбики – ложнооперированные животные +0,9% NaCl, темно-серые столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + 0,9% NaCl, заштрихованные столбики - крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + АТ-ГЛУ 250 мкг/кг, светло-серые столбики - крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры +  $\gamma$ -глобулин от интактных кроликов 250 мкг/кг. Примечание:  $p < 0,05$ ; \* - по сравнению с группой ложнооперированных крыс; # - по сравнению с группой крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры, & - по сравнению с группой крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры, получавших  $\gamma$ -глобулин от интактных кроликов.

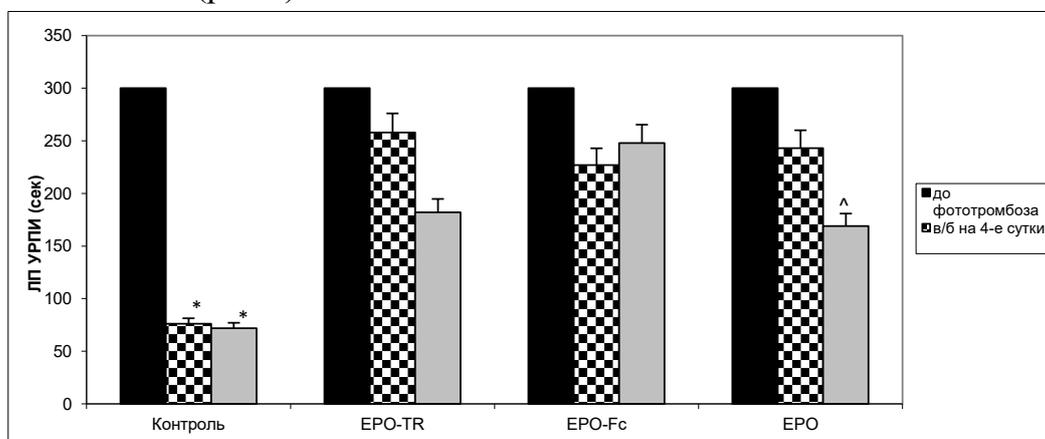
В гиппокампе в первые сутки после фототромбоза ишемизированных животных, получавших NaCl 0,9%, достоверно повышался уровень ДА (N = 24) - 12,53 (P=0,0057) (рис.2). Эта тенденция сохранялась в группах с введением АТ-ГУ и  $\gamma$ -глобулина. Оборот ДА (ДОФУК/ДА) в первые сутки у ишемизированных животных, получавших NaCl 0,9%, достоверно повышался и имел тенденцию к значительному снижению в группах с введением АТ-ГЛУ  $\gamma$ -глобулина. К 8-м суткам уровень ДА был резко снижен во всех группах по отношению к ложнооперированному контролю, тогда как оборот (ДОФУК/ДА) к 8-м суткам возрастал в группе, получавшей АТ-ГЛУ по отношению к ишемизированной группе без лечения. Уровень 5-ОТ в гиппокампе во всех экспериментальных группах в первые сутки после ишемического повреждения префронтальной коры не отличался от контрольного. К 8-м суткам эти показатели имели тенденцию повышения по отношению к контролю. Значительно менялся уровень метаболита серотонина 5-ОИУК: этот показатель был в первые сутки после фототромбоза достоверно выше контроля в ишемизированной группе по отношению к ложнооперированному контролю и достоверно ниже в группе с введением  $\gamma$ -глобулина в сравнении с группой с ишемическим повреждением без лечения.

Следовательно, к восьмым суткам после ишемии уровень метаболита 5-ОИУК оставался в указанных группах повышенным по сравнению с контрольными значениями. Оборот серотонина (5-ОИУК/50Т) в гиппокампе в первые сутки возрастал в группе с ишемическим повреждением по сравнению с контролем. На 8-е сутки оборот серотонина незначительно отличался от контроля во всех группах.

### **Влияние производных эритропоетина на нарушение поведения и объем очага при двустороннем ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга**

В результате исследования нейропротективного и антиамнестического эффектов карбамилированных форм эритропоетина (ЕРО) при внутрибрюшинном и интраназальном способах введения на модели фототромбоза сосудов префронтальной коры мозга крыс показано, что при внутрибрюшинном введении указанных производных эритропоетина, ЛП УРПИ на 4-ые сутки после ишемии составлял для

ЕРО-TR - 258 сек, ЕРО-Fc - 227 сек, ЕРО – 243 сек соответственно. При интраназальном введении этот показатель составил для ЕРО-Fc - 248 сек, ЕРО-TR - 182 сек и ЕРО – 169 сек. Следовательно, антиамнестический эффект ЕРО-TR был более выражен при внутрибрюшинном введении, тогда как при интраназальном введении был более эффективен ЕРО-Fc (рис.3).



**Рисунок 3.** Влияние внутрибрюшинного (50 мкг/кг) и интраназального (25 мкг/кг) введения карбамилированных форм белков ЕРО, ЕРО-TR, ЕРО-Fc на сохранение УРПИ у крыс с двухсторонним фототромбозом префронтальной коры. Примечание: \* -  $p < 0,001$  по сравнению с ЛП до фототромбоза; ^ -  $p < 0,05$  по сравнению с ЛП до фототромбоза.

Для морфометрического измерения объема ишемического очага использовали мозг тех же экспериментальных животных, фиксированный на 4-ые сутки после окончания исследования. При внутрибрюшинном введении коэффициент защитного эффекта (КЭЭ) был достоверен только для пролонгированного препарата ЕРО-TR, где снижение объема повреждения составило 34% (Романова Г.А., Шакова Ф. и др., 2014). При интраназальном введении производных эритропоэтина объем ишемического повреждения достоверно ( $P < 0,05$ ) снижался по отношению к нелеченым животным с фототромбозом префронтальной коры ( $28,9 \pm 2,2$ ) как при введении ЕРО-TR ( $15,0 \pm 1,8$ ,  $P < 0,05$ ), так и при введении ЕРО-Fc ( $14,3 \pm 2,5$ ,  $P < 0,05$ ).

**Таблица 1.** Морфометрическое измерение среднего и суммарного (на крысу) объема очага ишемического повреждения по группам

Группы животных	0.9% раствор NaCl, 0.5 мл	ЕРО	ЕРО-TR	ЕРО-Fc
Суммарный объем ( $\text{мм}^3$ ) повреждения мозга на крысу при интраназальном введении	$28,9 \pm 2,2$	$21,8 \pm 1,9$	$15,0 \pm 1,8^*$	$14,3 \pm 2,5^*$
Суммарный объем ( $\text{мм}^3$ ) повреждения мозга на крысу при внутрибрюшинном введении	$24,22 \pm 4,7$	$28,8 \pm 7,5$	$15,8 \pm 5,4^*$	$23,5 \pm 4,0$

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с группой с введением раствора NaCl 0,9%

При сравнении 2-х способов введения показана нейропротективная активность гибридных белков, с наиболее выраженным эффектом при внутрибрюшинном введении ЕРО-TR и интраназальном введении ЕРО-Fc (табл. 1).

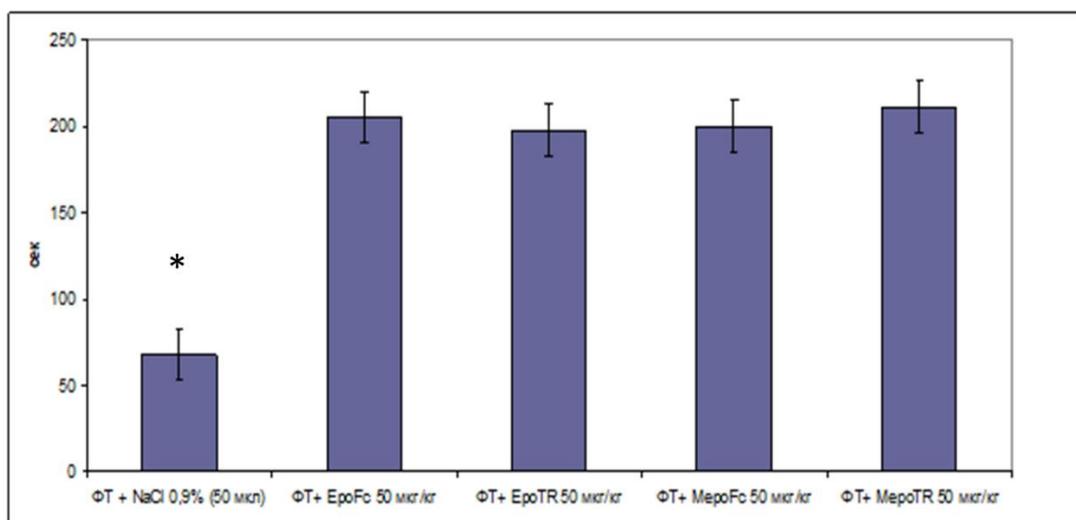
При интраназальном способе введения, самый высокий защитный эффект выявлен у ЕРО-Fc - 47,02%, несколько ниже у ЕРО-TR в той же серии опытов – 45,13%, КЭЗ ЕРО составил 24,6%. Следовательно, при интраназальном введении ЕРО-Fc и ЕРО-TR после двустороннего фотохимического повреждения префронтальной коры крыс получены данные, свидетельствующие об антиамнестическом и нейропротективном действии данных карбамилированных гликопептидных производных ЕРО. Наши данные хорошо согласуются с данными других авторов, которые продемонстрировали, что при интраназальном введении, эритропоэтин эффективно преодолевает гемато-энцефалический барьер и обладает нейропротекторными свойствами даже при уменьшении дозы введения. что было показано на модели фокальной церебральной ишемии (Yue-Ping Y., 2005; Rodríguez Cruz Y., 2010).

Представляет интерес то, что при интраназальном введении препараты ЕРО-TR и ЕРО-Fc показали значительно большую эффективность, чем ЕРО. Этот феномен, по-видимому, может быть объяснен пролонгированностью данных гибридов эритропоэтина. Необходимо отметить, что наибольшая нейропротекторная и антиамнестическая активность была достигнута при интраназальном введении ЕРО-Fc. Учитывая присутствие неонатального Fc $\alpha$  рецептора на клетках эпителия сосудов мозга, можно предположить, что взаимодействие этого белка с рецептором помогает более эффективному проникновению ЕРО-Fc в мозг и как следствие более эффективному цитопротекторному действию.

### **Влияние производных эритропоэтина на содержание в сыворотке крови белка S100b у крыс с ишемическим повреждением головного мозга**

Белок S100b считается маркером повреждения мозговой ткани. Высокие концентрации белка обнаруживаются при травмах головного мозга, нейродегенеративных и цереброваскулярных поражениях, в том числе, при инсультах. Оценка терапевтической эффективности производных эритропоэтина и его мутантных белков проводилась по степени сохраненности когнитивных функций, нарушенных при фотохимическом повреждении сосудов префронтальной коры головного мозга крыс и уровню белка S100b в сыворотке крови этих животных. Сравнивали показатели латентного периода в тесте УРПИ и уровня содержания белка S100b.

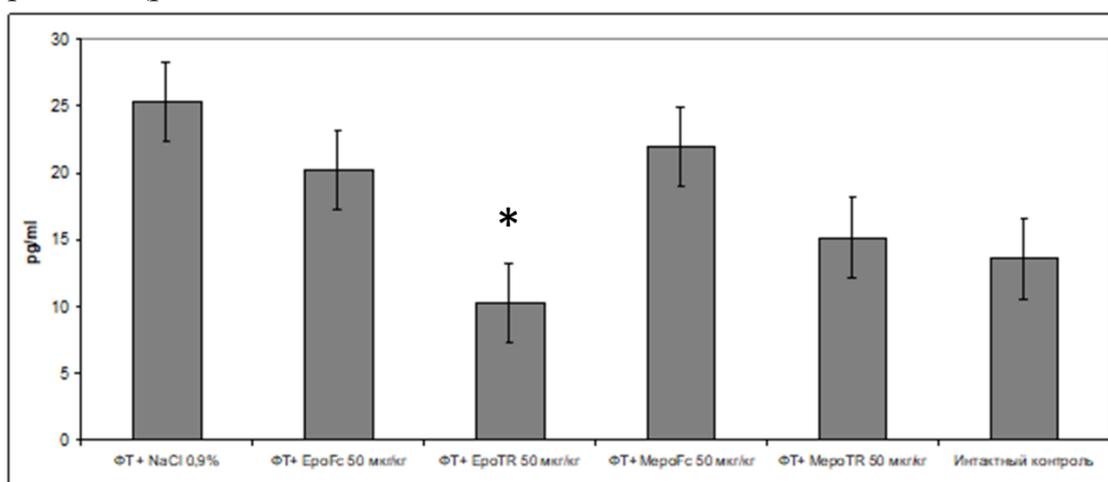
При однократном интраназальном введении производных эритропоэтина и их мутантных форм, ЛП УРПИ на 4-ые сутки после ишемии при введении ЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг составил 205 сек, ЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг - 198 сек, МЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг – 200 сек, МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг – 211 сек, у контрольной группы, получавшей 50 мкл NaCl 0,9% этот показатель составил 68 сек (рис.4).



**Рисунок 4.** Влияние интраназального введения производных эритропоэтина - ЕРО-Fc и ЕРО-TR и их мутантных форм - МЕРО-TR и МЕРО-Fc на сохранение УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры. По оси абсцисс: группы экспериментальных животных - фототромбоз (ФТ) + 50 мкл NaCl 0,9%; ФТ+ЕРО-Fc (50 мкг/кг), ФТ+ЕРО-TR (50 мкг/кг), ФТ+МЕРО-Fc (50 мкг/кг), ФТ+МЕРО-TR (50 мкг/кг). По оси ординат: латентный период условного рефлекса пассивного избегания (ЛП УРПИ, сек) соответствующих экспериментальных групп на 4-е сутки после фототромбоза. Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с ЛП УРПИ всех экспериментальных групп: ФТ+ЕРО-Fc, ФТ+ЕРО-TR, ФТ+МЕРО-Fc, ФТ+МЕРО-TR

Полученные данные показали достоверное сохранение выработанного до ишемии памятного следа (УРПИ) как при введении стандартных доз производных эритропоэтина ЕРО-Fc и ЕРО-TR, так и их мутантных форм МЕРО-Fc и МЕРО-TR.

Исследование содержания в сыворотке крови белка S100b у крыс с фотохимическим ишемическим повреждением головного мозга и влияние производных эритропоэтина и его производных проводилось на 4-е сутки после фототромбоза (рис. 5).



**Рисунок 5.** Влияние интраназального введения производных эритропоэтина - ЕРО-Fc и ЕРО-TR и их мутантных форм - МЕРО-TR и МЕРО-Fc на содержание белка S100b в сыворотке крови крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры.

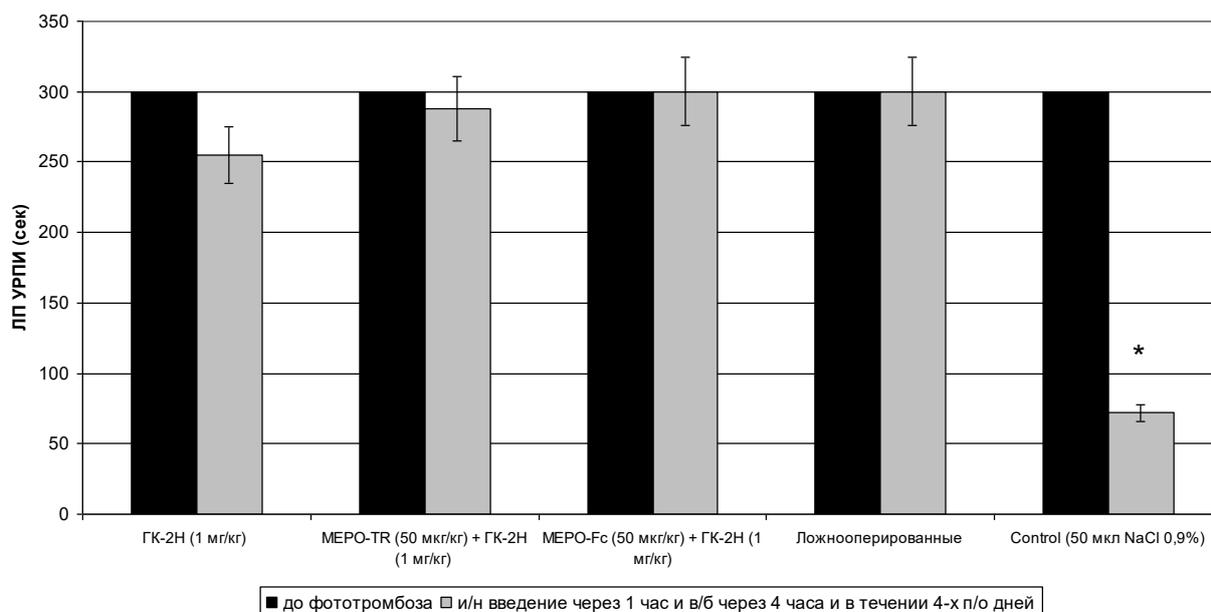
По оси абсцисс: группы экспериментальных животных: Фототромбоз (ФТ) + 50 мкл NaCl 0,9%); ФТ+ЕРО-Fc (50 мкг/кг), ФТ+ЕРО-TR (50 мкг/кг), ФТ+МЕРО-Fc (50 мкг/кг), ФТ+МЕРО-TR (50 мкг/кг), интактный контроль. По оси ординат: содержание белка S100b (pg/ml) в сыворотке крови крыс на 4-е сутки после фототромбоза. Примечание. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой Фототромбоз+50 мкл NaCl 0,9%.

В результате исследования показано двукратное повышение уровня белка S100b у крыс с фотохимическим повреждением префронтальной коры по сравнению с интактным контролем. При однократном интраназальном введении производных эритропоэтина - ЕРО-Fc, ЕРО-TR, МЕРО-Fc и МЕРО-TR после двустороннего фотохимического повреждения префронтальной коры головного мозга крыс получены данные, свидетельствующие об антиамнестическом действии всех испытуемых соединений. Исследование уровня белка S100b у тех же животных на 4-е сутки после ишемического повреждения на фоне терапии, показало что при введении ЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг уровень S100b в крови достоверно снижался ( $P < 0,05$ ), что указывает на нейропротективный эффект, а при введении других производных отмечена тенденция к снижению уровня S100b, которая наиболее выражена у МЕРО-TR.

### **Влияние комбинированной терапии на морфофункциональные нарушения при фотохимическом ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга**

Целью данного этапа исследования было изучение влияния комплексной терапии, включающей производные эритропоэтина и дипептидный миметик человеческого фактора роста нервов ГК-2h на воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания и объем поражения у крыс с ишемическим повреждением префронтальной области коры мозга. Введение производных молекул эритропоэтина ЕРО - МЕРО-TR, МЕРО-Fc производилось интраназально (и/н) однократно в дозе 50 мкг/кг через 1 час после фототромбоза. Дипептидный миметик ГК-2H вводили внутривентрикулярно (в/б) в дозе 1 мг/кг через 4 часа после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс в течение 4-х послеоперационных дней.

В результате исследования показано, что при однократном интраназальном введении производных эритропоэтина и их мутантных форм производных эритропоэтина в дозе 50 мкг/кг через 1 час после операции совместно с внутривентрикулярным введением дипептидного миметика ГК-2h в дозе 1 мг/кг через 4 часа после двустороннего фототромбоза и в течение 4-х послеоперационных дней, ЛП УРПИ на 4-ые сутки после ишемии при введении МЕРО-Fc +ГК-2h составил 300 сек, МЕРО-TR+ГК-2h - 288 сек, ГК-2h – 245 сек, у контрольной группы, получавшей 50 мкл NaCl 0,9% этот показатель составил 68 сек. (рис. 6). Полученные данные показали достоверное сохранение выработанного до ишемии УРПИ как при введении ГК-2h, что было подтверждено ранее (Романова Г.А. и др., 2010), так и при комплексной терапии. При этом, ЛП УРПИ при введении МЕРО-Fc + ГК-2h достиг дооперационного показателя (300 сек), что свидетельствует о высокой эффективности выбранного комплекса комбинированной терапии.



**Рисунок 6.** Влияние комплексной терапии на сохранение УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры.

По оси абсцисс - группы экспериментальных животных: ГК-2h (1 мг/кг), МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг), МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг), ложнооперированные, Control (50 мкл NaCl 0,9%). Темные столбики – показатели группы до фототромбоза, серые столбики – показатели группы после однократного интраназального введения вещества на 4-е сутки после фототромбоза. По оси ординат: латентный период условного рефлекса пассивного избегания (ЛП УРПИ, сек) соответствующих экспериментальных групп в секундах. Темные столбцы – до фототромбоза, светлые – на 4-е сутки после фототромбоза. Примечание \* $p < 0.01$  по сравнению с ЛП до фототромбоза.

МРТ- исследование показало (таб.2), что суммарный объем поражения мозга крысы при фототромбозе составил 29,1 мм<sup>3</sup>. В группе животных, получавших ГК-2h, на 4-е сутки после операции имело место уменьшение объема повреждения на 20% - 23,5 мм<sup>3</sup> по сравнению с группой, получавшей 0,9% раствор NaCl ( $P < 0,06$ ). При введении комбинаций МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг), МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг) у животных наблюдалось достоверное снижение объема повреждения до 21,5 и 20,6 ( $P < 0,05$ ), что соответствовало значениям при монотерапии МЕРО-Fc (50 мкг/кг) и МЕРО-TR (50 мкг/кг).

**Таблица 2.** МРТ- исследование суммарного объема очага ишемического повреждения по экспериментальным группам

Группы животных	0.9% NaCl, 0.5 мл	ГК-2h (1 мг/кг)	МЕРО-Fc (50мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг)	МЕРО-TR (50мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг)
Суммарный объем (мм <sup>3</sup> ) повреждения мозга на крысу при интраназальном введении	29,1	23,5	20,6*	21,5*

Примечание. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой с введением раствора NaCl 0,9%.

При этом стоит отметить, что рассчитанный коэффициент эффективности защиты (таб.3) оказался самым высоким при введении МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг) и составил 100%, несколько ниже 94% при введении комплекса МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2H (1 мг/кг), что оказалось достоверно выше ( $P < 0,05$ ) коэффициента защиты при монотерапии мутантными производными эритпропоэтина – по 56% для МЕРО-Fc (50 мкг/кг) и МЕРО-TR (50 мкг/кг) соответственно и выше этого показателя у ГК-2h.

**Таблица 3.** Влияние ГК-2h, МЕРО-Fc, МЕРО-TR и их комбинаций на воспроизведение УРПИ на модели фотохимического ишемического повреждения

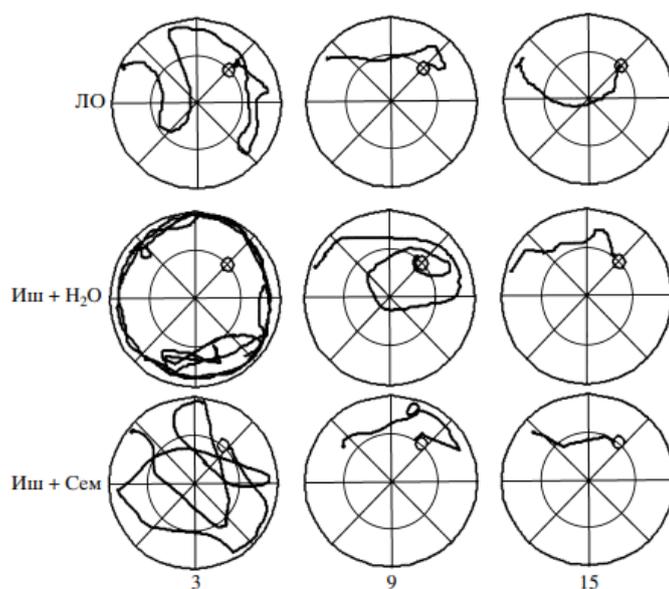
Группы животных	МЕРО-TR (50мкг/кг)	МЕРО-Fc (50 мкг/кг)	ГК-2h (1 мг/кг)	МЕРО-TR (50мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг)	МЕРО-Fc (50мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг)
ЛП ложнооперированных животных, с	300	300	300	300	300
ЛП контрольных животных с фототромбозом, с	72	72	92	92	92
ЛП опытных животных с фототромбозом, с	201*	200*	245*	288*	300*
Эффективность лечения, А (%)	56	56	73	94 <sup>^</sup>	100 <sup>^</sup>

Примечание: эффективность рассчитывали по формуле  $A(\%) = 100 * (\text{ЛП (фототромбоз с веществом)} - \text{ЛП (фототромбоз)}) / \text{ЛП (ложнооперированные)} - \text{ЛП (фототромбоз)}$ . \* -  $p < 0,05$  – достоверное отличие от контрольных животных с фототромбозом; <sup>^</sup> -  $p < 0,05$  – достоверное отличие от групп МЕРО-TR (50 мкг/кг) и МЕРО-Fc (50 мкг/кг)

Таким образом, комбинированная терапия показала выраженный нейропротективный эффект. Полученные данные свидетельствуют о корреляции между снижением объема повреждения и воспроизведением УРПИ. Эффект был наиболее выражен при введении комплекса МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг).

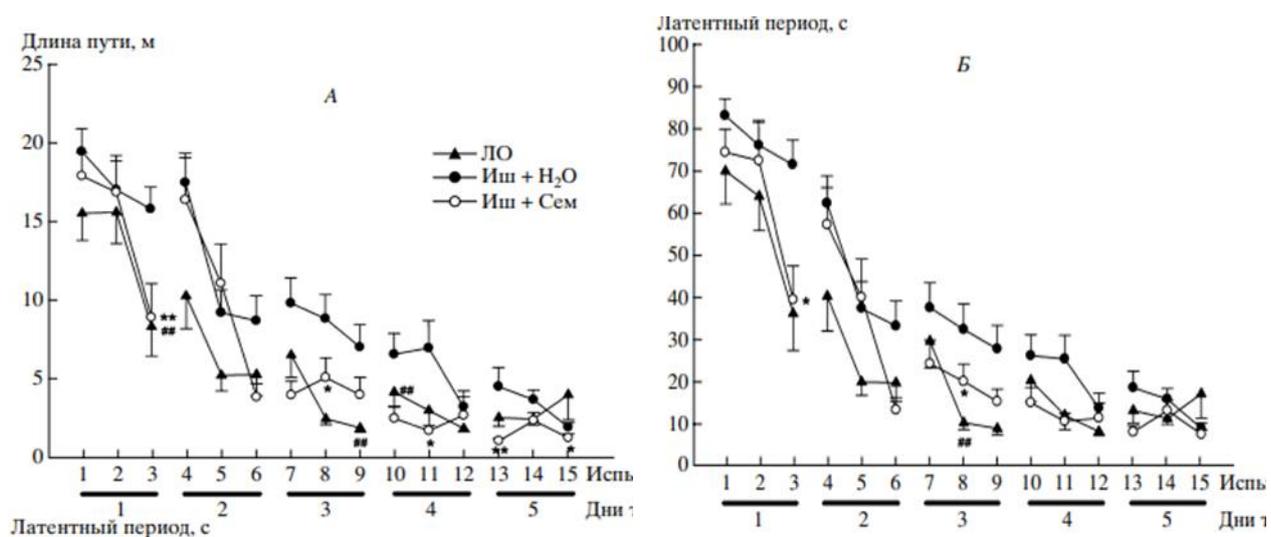
### **Формирование пространственной памяти у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга: эффекты синтетического аналога АКТГ<sub>4-7</sub>**

Целью данного этапа исследования была оценка нарушения пространственной памяти у крыс с двусторонним ишемическим повреждением префронтальной коры мозга и влияние на эти процессы синтетического аналога АКТГ<sub>4-7</sub> (Семакс).



**Рисунок 7.** Примеры треков движения крыс в одном лабиринте на разных сроках обучения. Номера испытаний указаны внизу под рисунками. ЛО - ложнооперированные крысы. Иш - H<sub>2</sub>O-контрольные крысы с ишемическим повреждением коры головного мозга, Иш - Сем - крысы с ишемическим повреждением коры мозга и курсовым введением Семакса.

В процессе обучения животных в водном лабиринте Морриса, наблюдали изменение стратегии поиска скрытой платформы (рис. 7). В первых испытаниях крысы плавали вдоль стенок бассейна, тогда как в последующих начинали исследовать всю поверхность бассейна. При этом у ишемизированных животных без лечения изменение стратегии поиска происходило несколько позже, чем у ложнооперированных и животных с ишемией, получавших аналог АКТГ<sub>4-7</sub> (Семакс).



**Рисунок 8.** Изменение средней скорости плавания крыс водном лабиринте через 20-24 сут после операции. Данные представлены в виде среднее + ошибка среднего. -p < 0.05, \*\* - P < 0.01 - достоверно значимые различия группы Иш + Сем (Ишемия +Семакс) по сравнению с групп Иш + H<sub>2</sub>O.

В первом сеансе обучения подавляющее большинство животных не находило платформу в течение времени, отведенного на тест (рис. 8). В последующих сеансах обучения время поиска (ВП) постоянно снижалось и в последнем сеансе обучения у всех групп животных ВП составляло в среднем около 10 сек. Такая картина свидетельствует о формировании пространственной памяти и сохранении выработанного навыка нахождения платформы в процессе обучения.

**Таблица 4.** Различия между группами при пространственном обучении крыс в водном лабиринте через 20-24 суток после операции

Показатель	Статистический критерий; вероятность	День обучения/номер испытания								
		1/3	3/8	3/9	4/10	4/11	4/12	5/13	5/14	5/15
ДП, м	$H^a$ ; $p^a$	11.1; 0.0039	9.1; 0.0105	8.3; 0.0156	7.5; 0.0232	10.8; 0.0050		11.5; 0.0032		7.1; 0.0291
ВП, с	$H^a$ ; $p^a$	14.2; 0.0008	7.5; 0.0238	8.35; 0.0153						
ССП, м/с	$F^b$ ; $p^b$		3.8; 0.0295		8.5; 0.0008	3.4; 0.0440	6.0; 0.0050		9.8; 0.0003	4.2; 0.0207

Примечание. Исследование группы животных: ЛО (n=23), Иш + H<sub>2</sub>O (n = 13) Иш + Сем (n=12). ДП – длина пути; ВП – время поиска платформы; ССП -средняя скорость плавания; - <sup>a</sup>ANOVA с критериями Краскел – Уоллиса; <sup>b</sup>ANOVA для выборок с нормальным распределением

**Таблица 5.** Результаты контрольного тестирования крыс в водном лабиринте через 24 ч после завершения цикла обучения

Группа	Число пересечений места расположения платформы		Процент животных, пересекших место расположения платформы в период 0-30 с	Процент времени, проведенного животными в целевом квадранте бассейна в период 0-90 с
	период 0-30 с	период 0-90 с		
ЛО	1.3±1.0	3.0±1.5	79	42.1±8.9 <sup>#</sup>
Иш+ H <sub>2</sub> O	1.3±1.0	3.3±1.5	80	34.3±11.4
Иш+Сем	1.3±0.8	3.5±1.3	92	30.8±6.4

Примечание. Платформа располагалась в центре квадранта 1 («целевой квадрант»). Данные представлены в виде: среднее±стандартное отклонение. <sup>#</sup>-p<0.05 по сравнению с Иш + H<sub>2</sub>O

Дисперсионный анализ выявил статистически значимые различия по показателю длины пути плавания крысы в бассейне между тремя экспериментальными группами в 1-й, 3-й, 4-й и 5-й дни обучения (табл. 4). Вместе с тем по ВП статистически значимые различия между группами были выявлены только на 1-й и 3-й дни обучения.

Курсовое введение Семакса после ишемического повреждения префронтальной области коры головного мозга оказывало значительное влияние на поведение животных в водном лабиринте Морриса (табл. 4, рис. 8 Б). Анализ показал, что группы Ишемия + Семакс (Иш + Сем) и Ишемия + вода для инъекций (Иш + H<sub>2</sub>O) статистически значимо различаются по этому показателю в 3-м, 8-м, 11-м, 13-м и 15-м испытаниях (рис. 8 А). В то же время наиболее выраженные различия в значениях ВП между группами Иш + H<sub>2</sub>O и Иш + Сем наблюдали в первом и втором сеансах обучения (рис. 8 Б).

Значения средней скорости плавания (ССП) в группах Иш + H<sub>2</sub>O и ЛО практически не различались в течение всего цикла обучения, что указывает на отсутствие нарушений в двигательной активности при ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга (рис. 8). Следует отметить, что у крыс, получавших Семакс, на 4-й и 5-й дни тестирования наблюдали снижение ССП на 30-40%, что, возможно, связано с лучшей адаптацией к условиям эксперимента у этой группы животных.

Для оценки прочности сформированной пространственной памяти на следующий день после окончания обучения проводили контрольный тест. Определяли число пересечений места расположения платформы, суммарное время нахождения животных в квадрантах и процент животных, пересекших место расположения платформы в течение первых 30 с (табл. 5). Анализ полученных данных не выявил каких-либо существенных различий между исследуемыми группами животных.

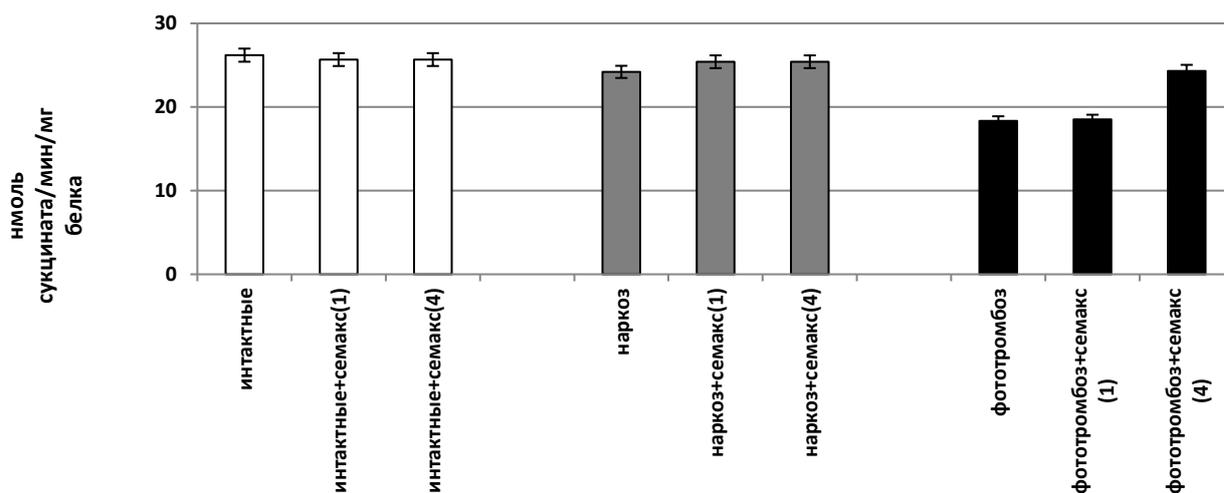
Таким образом, двустороннее ишемическое повреждение префронтальной области коры мозга приводит к ухудшению пространственного обучения в водном лабиринте Морриса через 20-24 суток после операции. Курсовое интраназальное введение синтетического аналога АКТГ<sub>4-7</sub> в течение первых шести дней после фототромбоза приводит к уменьшению времени поиска платформы и к сокращению длины пути до ее достижения. Полученные данные указывают на наличие антиамнестического действия Семакс на отдаленных сроках (20-24 дня) после двустороннего ишемического повреждения префронтальной области коры мозга, играющей важную роль в выработке пространственной памяти.

### **Влияние синтетического аналога АКТГ<sub>4-7</sub> на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий при двустороннем фотохимическом ишемическом повреждении коры головного мозга крыс**

Целью данного этапа исследования была оценка влияния аналога АКТГ<sub>4-7</sub> (Семакс) при однократном и курсовом интраназальном введении на активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) митохондрий в остром периоде при двустороннем

фотохимическом ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс.

Через 2 часа после фотоиндуцируемого тромбоза префронтальной коры было установлено снижение активности СДГ в перифокальной зоне на 15% по сравнению с интактным контролем. Данный показатель в эти же сроки снижался также у наркотизированных крыс без фототромбоза и составил 8% по сравнению с контрольной группой. Через 24 часа после ишемического повреждения коры снижение активности СДГ в перифокальной зоне усугубилось и составило уже 30% по сравнению с интактным контролем (рис.9).



**Рисунок 9.** Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) митохондрий префронтальной коры головного мозга при однократном и четырехкратном введении Семакса. По оси абсцисс отмечены группы животных: 1 – однократное введение Семакса интраназально в дозе 25 мкг/кг, 4 – четырехкратное введение Семакса интраназально в дозе 25 мкг/кг. Примечание: \* - данные статистически значимо отличаются от контроля ( $p < 0,05$ ).

Однократное интраназальное введение Семакса через 1 час после фототромбоза в дозе 25 мкг/кг повысило активность СДГ до уровня интактного контроля, но эффект был кратковременным и не определялся через 24 ч после ишемического повреждения. Применение 4-кратной суточной схемы введения Семакса с 6-часовыми интервалами позволило получить устойчивый эффект нормализации активности СДГ в перифокальной зоне префронтальной коры. На активность СДГ у интактных крыс Семакс не повлиял. Внимания заслуживает эффект подавления активности СДГ в перифокальной зоне, который прогрессировал во времени и составил 30% через 24 ч после фототромбоза. Снижение оксигенации (гипоперфузия) может привести к угнетению механизмов индукции дыхательных ферментов и снижению общей удельной активности СДГ в области пенумбры. Кроме того, данные могут свидетельствовать об усилении апоптоза в периинфарктной зоне и связанной с ним деградации митохондрий. Обнаруженный в раннем постишемическом периоде (2 ч после фототромбоза) эффект активации СДГ Семаксом и отсутствие этого эффекта через 24 ч после введения может свидетельствовать: 1 – о нормализующем действии препарата на нейротрансмитторный баланс, профиль цитокинов, нейротрофинов и

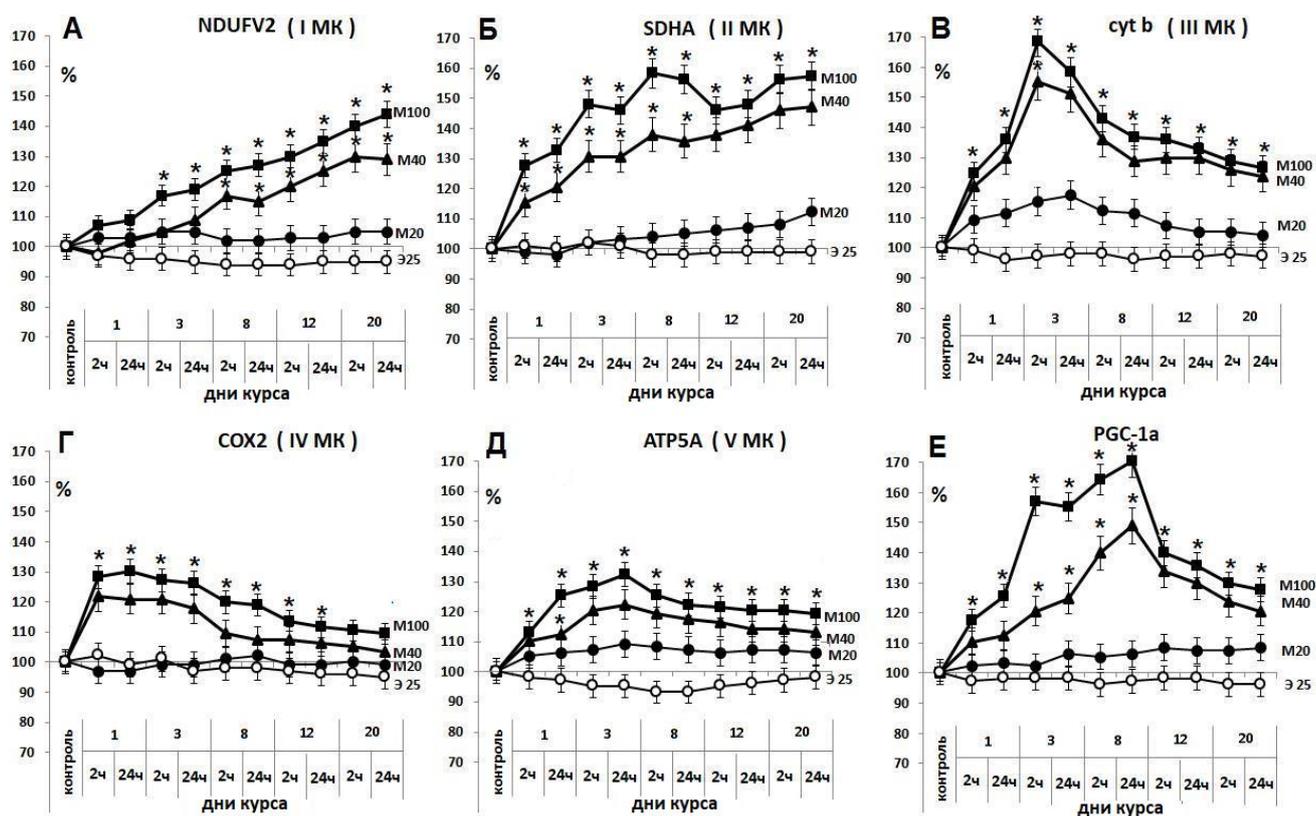
антиоксидантных ферментов, 2 – быстрой метаболизации/деактивации пептида (Гусев Е.И., Скворцова В.И. 2001). Курсовое введение Семакса в остром периоде ишемического повреждения головного мозга позволило получить устойчивый эффект нормализации активности СДГ в перифокальной зоне префронтальной коры.

### **Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на индукцию церебрального митохондриогенеза**

Цель данного этапа исследования - изучение дозозависимого влияния этилметилгидроксипиридина сукцината (Мексидол), который применяли в трех дозах: 20, 40 и 100 мг/кг на церебральный митохондриогенез. Эмоксипин (этилметилгидроксипиридина гидрохлорид; ЭМГП гидрохлорид) применяли в дозе 25 мг/кг с целью оценить изолированное влияние антиоксидантного компонента Мексидола на церебральный митохондриогенез. Внутривенные (в/в) инъекции выполняли ежедневно на протяжении 20 дней. Было проведено четыре серии экспериментов: 1 - курс Мексидола в дозе 20 мг/кг, М20; 2 - курс Мексидола в дозе 40 мг/кг, М40; 3 - курс Мексидола в дозе 100 мг/кг, М100; 4 - курс Эмоксипина в дозе 25 мг/кг, Э25.

Для оценки индукции митохондриогенеза методом вестерн-блот анализа определяли уровень экспрессии транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ , транскрипционных факторов NRF1 (nuclear respiratory factor 1) и TFAM (mitochondrial transcription factor A), каталитических субъединиц митохондриальных ферментов NDUFV2, SDHA, cyt b, COX2, ATP5A. Также в образцах коры головного мозга (КГМ) оценивали уровень экспрессии сукцинатного рецептора (SUCNR1/GPR91) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) – маркера активации SUCNR1.

В ходе исследования показано, что курсовое применение Мексидола в дозах свыше 20 мг/кг сопровождалось индукцией каталитических субъединиц всех четырех комплексов дыхательных ферментов митохондрий. При увеличении дозы от 40 до 100 мг/кг эффект индукции развивался раньше, был более выраженным и продолжительным. Эмоксипин не влиял на экспрессию каталитических субъединиц четырех комплексов дыхательной цепи (рис. 10 А-Г).



**Рисунок 10.** Динамика экспрессии каталитических субъединиц дыхательных ферментов (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX2) и АТФ-синтазы (ATP5A), транскрипционного коактиватора PGC-1α в коре головного мозга крыс при курсовом применении (внутрибрюшинные инъекции, ежедневно, 20 дней) мексидола в дозах 20, 40, 100 мг/кг и эмоксипина в дозе 25 мг/кг.

По оси ординат представлены данные вестерн-блот анализа в % от базового содержания тестируемых белков в КГМ крыс (в % от контроля). По оси абсцисс отмечены дни курса, когда производился забор ткани КГМ (через 2 ч и 24 ч после инъекции). \* - данные статистически значимо отличаются от контроля ( $p < 0,01$ ).

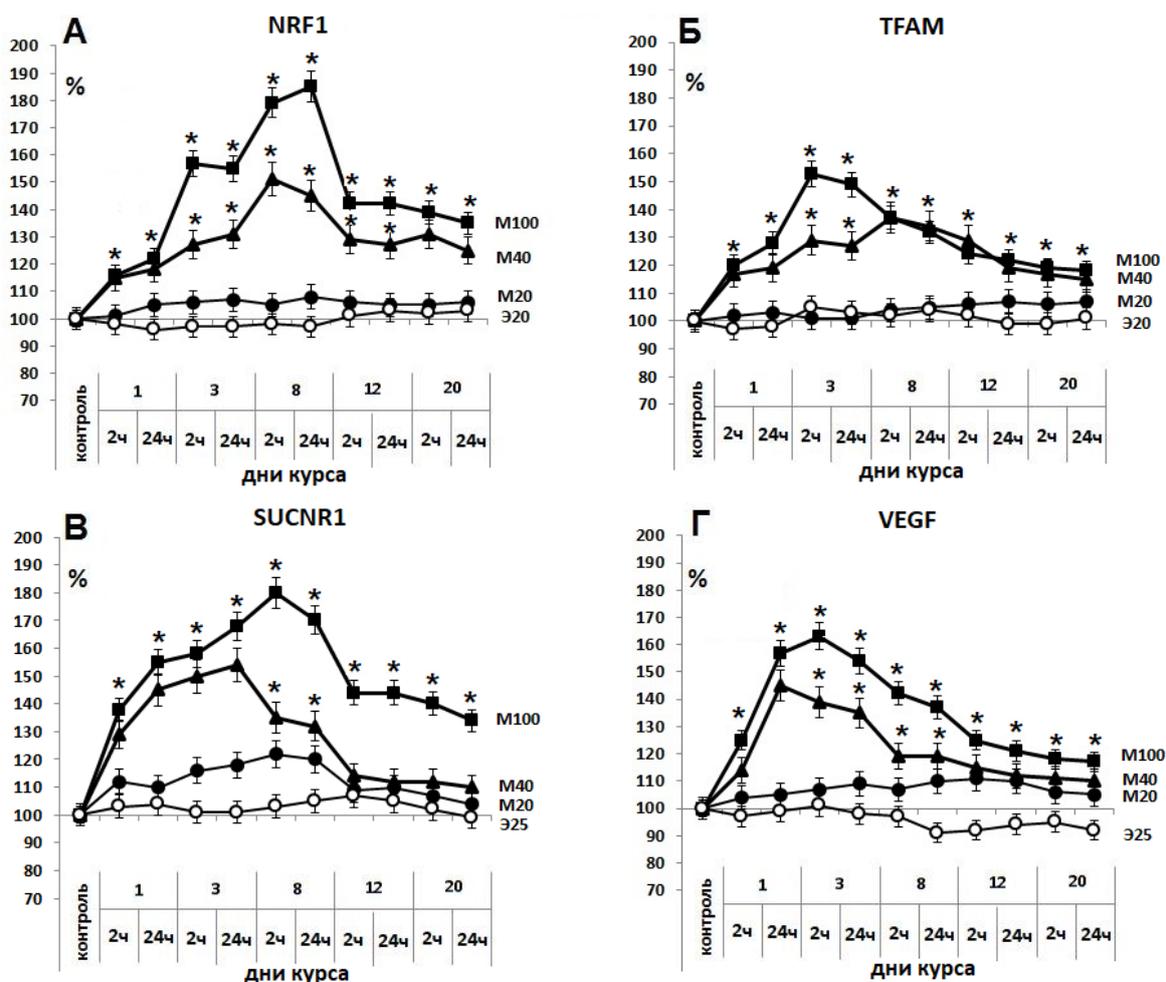
Наиболее значительной и длительной была индукция каталитической субъединицы сукцинатдегидрогеназы (СДГ) SDHA (рис. 10 Б). Увеличение уровня экспрессии субъединицы имело линейный характер, происходило дозозависимо на протяжении восьми дней курсов (40 и 100 мг/кг; 30% и 60%, соответственно), но на этапе 12-20 суток дозозависимые различия нивелировались, что свидетельствует о достижении максимального эффекта индукции SDHA. Для цитохрома b также отмечалась ранняя, выраженная, но менее продолжительная, в сравнении с SDHA, индукция (рис. 10 В). После 3-й инъекции Мексидола развивался максимальный в ходе курсов (40 и 100 мг/кг) уровень экспрессии cyt b (160 и 170% в сравнении с контролем), после чего снижался, составляя на этапе 8-20 дней курсов 130% и 140% соответственно.

Модель экспрессии каталитической субъединицы IV комплекса COX2 была сходна с cyt b, но индукция была менее выраженной (рис. 10 Г). Максимальный уровень экспрессии выявляли в первые три дня курсового применения Мексидола (130% и 140%, в сравнении с контролем), после чего к завершению курсов наблюдали снижение содержания COX2 до уровня контроля. Таким образом, отличительной особенностью мексидол-индуцированной экспрессии субъединиц дыхательной цепи является

первичная выраженная индукция гемсодержащих дыхательных ферментов (сyt b), синтез которых является сукцинатзависимым, сменяющаяся умеренной репрессией по мере усиления индукции СДГ (SDHA).

Индукция сyt b, имеющая ключевое значение в связи с увеличением экспрессии каталитической субъединицы NDUFV2 I комплекса дыхательных ферментов (рис. 10 А), происходила линейно дозозависимо на протяжении курсов Мексидола (40 и 100 мг/кг), составляя к 20 дню 30% и 40% соответственно. Модель экспрессии АТP5А отличался от субъединиц субстратного и цитохромного участков дыхательной цепи – содержание АТP5А было умеренно и равномерно повышено в ходе курсов применения Мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг, составляя 120 и 130% в сравнении с контролем соответственно (рис. 10 Д). Индукция каталитических субъединиц митохондриальных ферментов происходила сопряженно с дозозависимым увеличением уровня экспрессии PGC-1 $\alpha$  (рис. 10 Е), NRF1, TFAM (рис. 10 А, Б) при курсовом применении Мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг. Введение Мексидола в дозе 20 мг/кг не влияло на экспрессию коактиватора PGC-1 $\alpha$  и транскрипционных факторов NRF1 и TFAM. Эмоксипин также как и в случае с каталитическими субъединицами митохондриальных ферментов не влиял на экспрессию PGC-1 $\alpha$ , NRF1, TFAM.

В проведенном исследовании при курсовом применении Мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг было выявлено дозозависимое увеличение экспрессии SUCNR1 и сопряженная индукция VEGF (рис. 11 В, Г). Эта взаимосвязь была показана ранее, а индукция VEGF служит маркером активации SUCNR1 (He W., et al, 2004; Hamel D., 2014). В результате исследования впервые установлено, что сукцинатная сигнализация сопровождается в коре головного мозга (КГМ) не только увеличением экспрессии SUCNR1 и VEGF, но также индукцией ключевого регулятора митохондриогенеза млекопитающих PGC-1 $\alpha$  и маркеров биогенеза митохондрий - NRF1, TFAM, каталитических субъединиц дыхательной цепи и АТФ-синтазы.



**Рисунок 11.** Динамика экспрессии транскрипционных факторов NRF1 и TFAM, сукцинатного рецептора SUCNR1, фактора роста эндотелия сосудов VEGF в коре головного мозга крыс при курсовом применении (внутрибрюшинные инъекции, ежедневно, 20 дней) мексидола в дозах 20, 40, 100 мг/кг и эмоксипина в дозе 25 мг/кг.

По оси ординат представлены данные вестерн-блот анализа в % от базового содержания тестируемых белков в КГМ крыс (в % от контроля). По оси абсцисс отмечены дни курса, когда производился забор ткани КГМ (через 2 ч и 24 ч после инъекции). \* - данные статистически значимо отличаются от контроля ( $p < 0,01$ ).

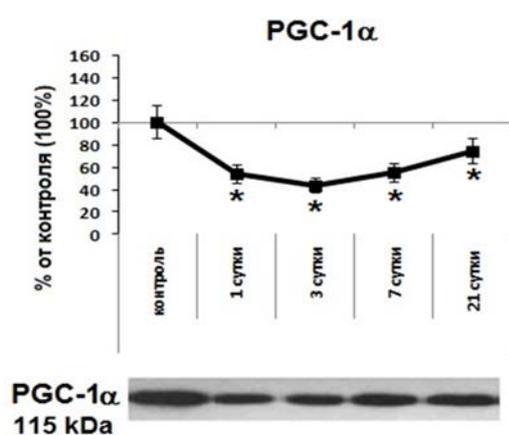
Таким образом, курсовое применение Мексидол в дозах 40 и 100 мг/кг сопровождается индукцией SUCNR1, VEGF, PGC-1 $\alpha$ , NRF1, TFAM, каталитических субъединиц дыхательных ферментов и АТФ-синтазы, не зависящей от этилметилгидроксипиридина, что свидетельствует о развитии сукцинат/SUCNR1-опосредованного церебрального митохондрио- и ангиогенеза.

### **Влияние острой ишемии на уровень транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ и экспрессию белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$ в коре головного мозга**

В данной серии экспериментов изучали влияние ишемического повреждения головного мозга на уровень транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  и уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$  в коре. Для этого методом иммуноблоттинга оценивали уровень экспрессии PGC-1 $\alpha$  и PGC-1 $\alpha$ -зависимых белков-маркеров митохондрио-, ангио-, синаптогенеза в перифокальной зоне префронтальной

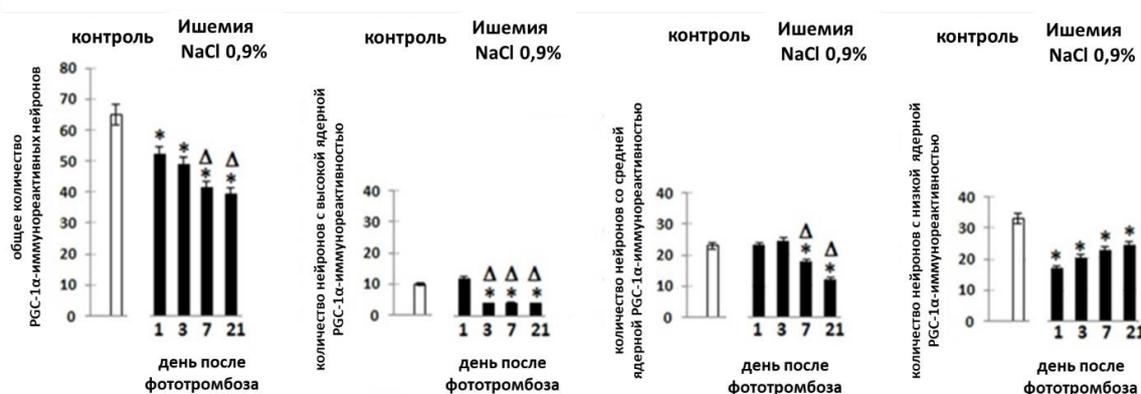
коры головного мозга крысы после ишемического повреждения на 3-й, 7-й, 21-й дни после ишемии. Оценку динамики уровня PGC-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов, площади инфаркта и протяженности периинфарктной зоны с клеточными изменениями проводили в те же сроки.

По результатам исследования, на модели фотоиндуцированного тромбоза сосудов префронтальной коры впервые показано устойчивое снижение содержания PGC-1 $\alpha$  в периинфарктной зоне ишемического очага головного мозга в остром постишемическом периоде (1-21 сутки), которое сохранялось в течении всего периода наблюдения. В 1-е, 3-и, 7-е сутки после ишемии уровень PGC-1 $\alpha$  оказался на 50% ниже по сравнению с интактным контролем, а на 21 сутки снижение составило 25% к исходному уровню (рис. 12).

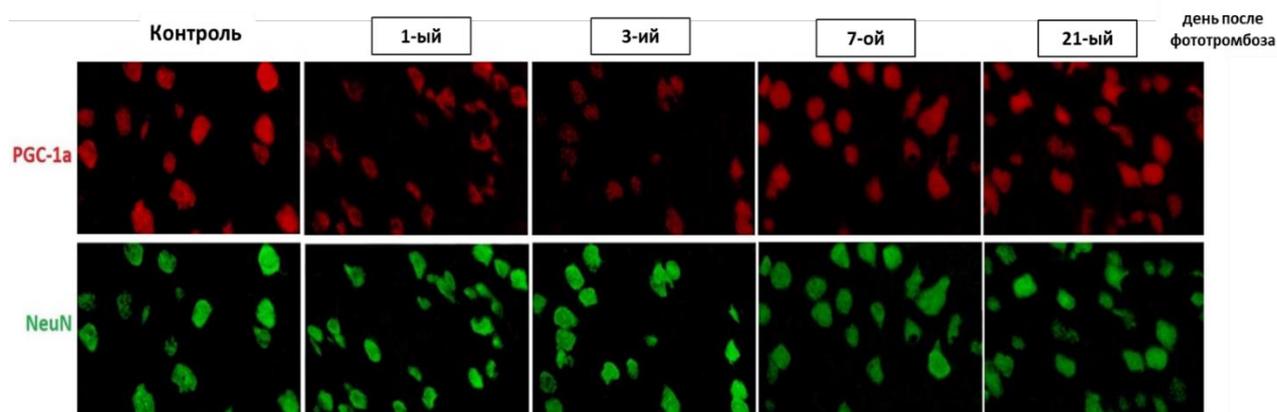


**Рисунок 12.** Динамика уровня экспрессии PGC-1 $\alpha$  в периинфарктной зоне префронтальной коры на 1-21 сутки после фотохимического ишемического повреждения.

Методом иммуногистохимии (ИГХ) показано прогрессирующее уменьшение общего числа PGC-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов в периинфарктной зоне, а также количества нейронов с высокой ядерной PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью. Исключение составили 1-е сутки после ишемии, когда количество нейронов с высокой PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью у ишемизированных животных не отличалось от интактного контроля (рис. 13, 14).



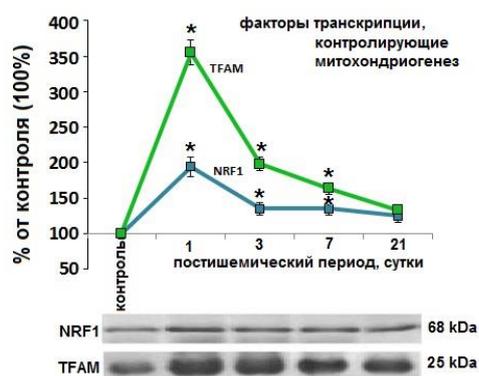
**Рисунок 13.** Динамика уровня активности PGC-1 $\alpha$  в периинфарктной зоне префронтальной коры (количество PGC-1 $\alpha$  - иммунореактивных нейронов) на 1-21 сутки после фотохимического ишемического повреждения.



**Рисунок 14.** Динамика уровня активности PGC-1 $\alpha$  в периинфарктной зоне префронтальной коры (содержание в ядре) на 1-21 сутки после фотохимического ишемического повреждения.

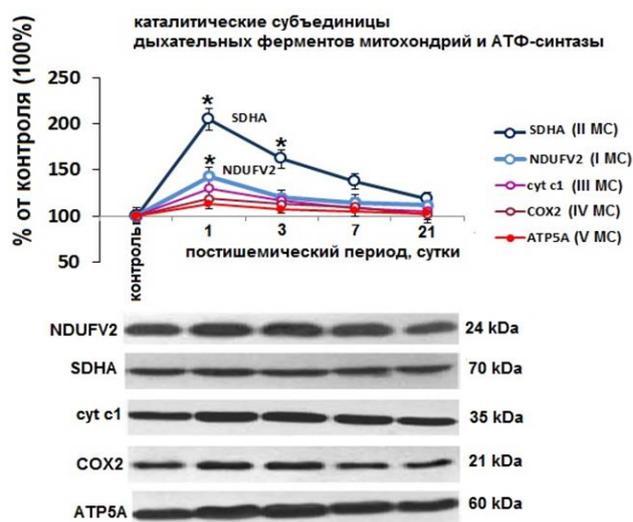
Высокое содержание PGC-1 $\alpha$  в ядре является косвенным подтверждением активации PGC-1 $\alpha$  (14).

При оценке динамики экспрессии транскрипционных факторов, наиболее значимые изменения отмечены при анализе уровня экспрессии белков-маркеров, контролирующих митохондриогенез: содержание транскрипционных факторов TFAM увеличилось спустя сутки после фототромбоза в 3,5 раза, NRF1 - в 2 раза (рис. 15). Это согласуется с данными литературы о том, что PGC-1 $\alpha$  признается главным активатором экспрессии транскрипционных факторов, контролирующих митохондриогенез (NRF1, TFAM) и экспрессию митохондриальных белков (Scarpulla R. C. et al, 2012; Ventura-Clapier R. et al, 2008).



**Рисунок 15.** Динамика уровня экспрессии белков-маркеров активности транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ , контролирующих митохондриогенез в периинфарктной зоне в 1-21 сутки постишемического периода.

Содержание каталитических субъединиц субстратного участка дыхательной цепи SDHA повышался в первые сутки в 2 раза, NDUFV2 – в 1,5 раза (рис. 16). В последующие сроки постишемического периода уровень белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$  снижался, также как уровень ядерной иммунореактивности PGC-1 $\alpha$ .



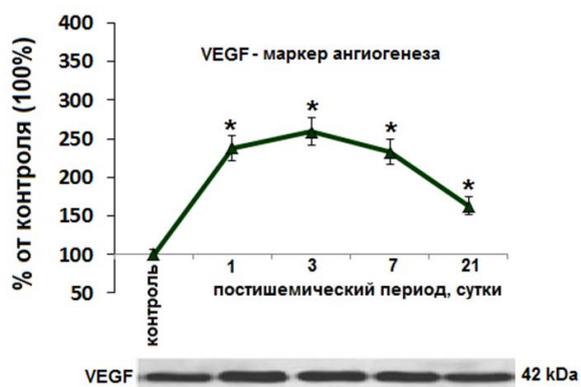
**Рисунок 16.** Динамика экспрессии белков-маркеров активности транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ , контролирующего митохондриогенез в перинфарктной зоне в 1-21 сутки постинфарктного периода.

Содержание синаптофизина повышалось на 30% в первые сутки постинфарктного периода и снижалось в последующие (рис. 17).



**Рисунок 17.** Динамика экспрессии синаптофизина SYP (белка-маркера активности транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ ), контролирующего синаптогенез в перинфарктной зоне в 1-21 сутки постинфарктного периода.

Динамика экспрессии VEGF (рис. 18) значительно отличалась от других белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$  - содержание VEGF было устойчиво повышенным в перифокальной зоне в постинфарктном периоде, наиболее выраженное в 1-7 сутки, что может быть связано с зависимостью экспрессии VEGF не только от активности PGC-1 $\alpha$ , но и от гипоксического фактора транскрипции HIF-1 $\alpha$ .

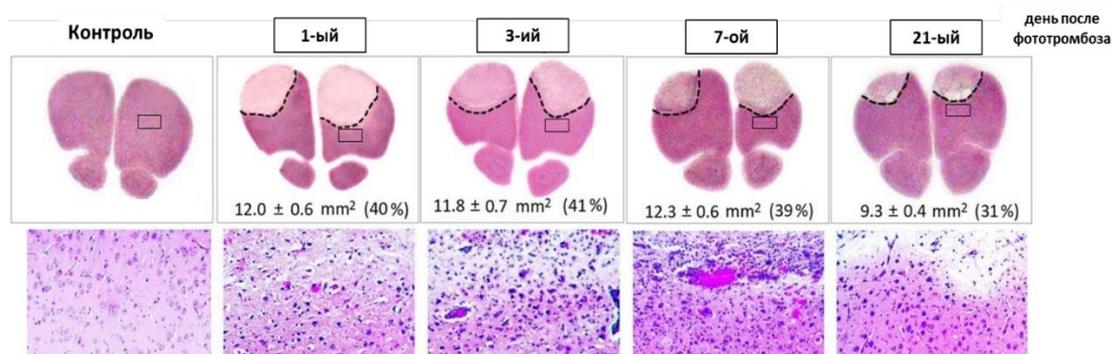


**Рисунок 18.** Динамика экспрессии синаптофизина SYP (белка-маркера активности транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ ), контролирующего синаптогенез в перинфарктной зоне в 1-21 сутки постинфарктного периода.

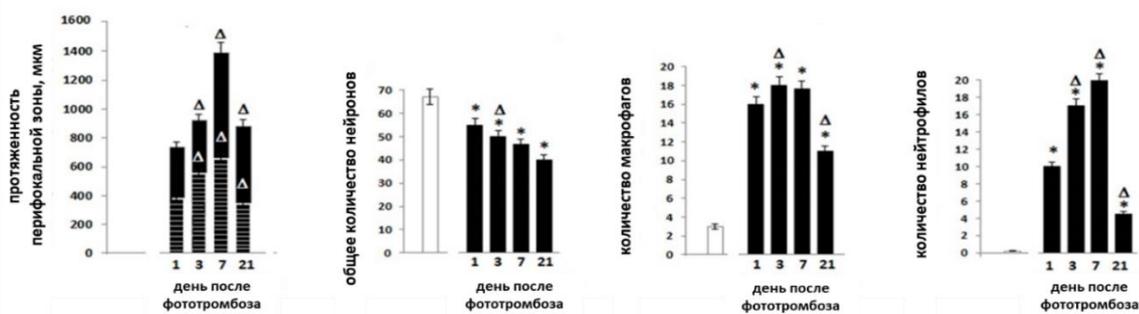
Таким образом, для оценки активности PGC-1 $\alpha$  при ишемическом повреждении коры головного мозга, наиболее специфичными и информативными оказались белки-маркеры митохондриогенеза NRF1 и TFAM.

Поскольку ранний постишемический период сопровождается выраженной воспалительной реакцией, был поведен гистологический анализ окрашенных гематоксилин-эозином серийных срезов префронтальной коры, который позволил выявить инфильтрацию зоны ишемической полутени макрофагами и нейтрофилами и проследить динамику размеров перифокальной зоны с клеточными изменениями.

На микрофотографиях срезов префронтальной коры на 3-и и 7-е сутки постишемического периода (рис. 19) видны области массивной инфильтрации вдоль внутренней границы зоны ишемического ядра иммунocyтaми, цитотоксические эффекты которых сопровождаются микрососудистыми нарушениями (эритроцитарные стазы, разрывы микрососудов), вторичной ишемизацией и 2-кратной прогрессией ишемической зоны полутени на 7 день в сравнении с 1-ми сутками.



А



Б

**Рисунок 19.** Динамика клеточного состава (А) и протяженности (Б) перифокальной зоны в 1-21 сутки после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга.

Полученные данные свидетельствуют о нарастании воспалительных явлений к 7-м суткам после ишемии. К 21-м суткам выраженность воспалительной реакции уменьшается: размеры периинфактной зоны (рис.19) с клеточными изменениями уменьшались вдвое по сравнению с 7-ми сутками, количество макрофагов при этом снижалось в 2 раза, нейтрофилов - в 3 раза.

## **PGC-1 $\alpha$ -модулирующая активность препаратов**

### **Влияние курсового применения нейропротекторных препаратов на размеры очага ишемии, протяженность и клеточный состав пенумбры.**

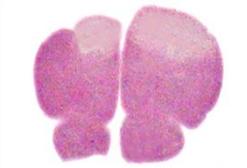
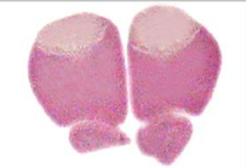
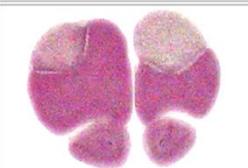
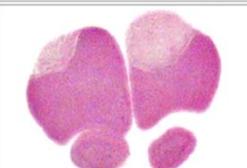
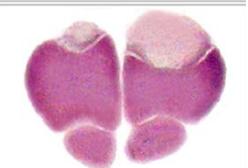
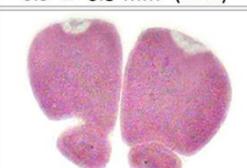
Цель данного этапа исследования - оценка потенциальной PGC-1 $\alpha$ -модулирующей активности двух препаратов, проявляющих множественные нейропротекторные эффекты и принадлежащих разным фармакологическим группам - 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (ЭМГПс, Мексидол) и пептида-миметика АКТГ<sub>4-7</sub> (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) (Семакс) на модели фотохимически индуцированного тромбоза сосудов префронтальной коры головного мозга крыс.

Препараты применяли 7-дневным курсом: Мексидол вводили внутривенно в дозе 100 мг/кг, Семакс - интраназально в дозе 25 мкг/кг. Уровень экспрессии PGC-1 $\alpha$  и PGC-1 $\alpha$ -зависимых белков-маркеров биогенеза митохондрий (NRF1, TFAM, NDUFV2, SDHA, сyt c1, COX2, ATP5A), ангиогенеза (VEGF), синаптогенеза (SYP) в перинфарктной зоне оценивали иммуноблоттингом на протяжении 21 дня постишемического периода (1-е, 3-и, 7-е сутки после фототромбоза и начала терапии и 14 дней после отмены препарата).

В ходе исследования показано, что спустя сутки после фототромбоза, очаг повреждения составил 40% от площади среза префронтальной коры ( $P < 0.05$ ; рис. 20). На 3-е и 7-е сутки размер очага значимо не менялся. К 21-м суткам наблюдалась ретракция зоны очага на 25% и появление кист, возможно, вследствие массивного фагоцитоза пораженной ткани.

Однократное введение ЭМГПс (Мексидол) и пептида-миметика АКТГ<sub>4-7</sub> (Семакс) через 2 ч после фототромбоза ограничивало распространение очага некроза спустя сутки после ишемического повреждения в 1,8 и 1,6 раз соответственно, по сравнению с группой «Ишемия + NaCl 0,9%» ( $P < 0.05$ ; рис.20). На протяжении 7 суток постишемического периода размер некротического очага значимо не менялся.

К 21 суткам ретракция зоны ядра инсульта для групп получавших Мексидол и Семакс составила 60% и 50%, соответственно, по сравнению с 7 сутками. На 21-й день постишемического периода очаг поражения у крыс, получавших Мексидол, оказался в 3,5 раза меньше, а у крыс, получавших Семакс, в 2,4 раза меньше по сравнению с группой без лечения (Ишемия + NaCl 0,9%) ( $P < 0.05$ ; рис. 20).

	Ишемия + NaCl 0,9%	Ишемия + ЭМГПс	ИШЕМИЯ + АКТГ <sub>4-7</sub>
1 день	 12.0 ± 0.6 mm <sup>2</sup> (40%)	 6.6 ± 0.3 mm <sup>2</sup> (25%) *	 7.3 ± 0.4 mm <sup>2</sup> (29%) *
3 день	 11.8 ± 0.7 mm <sup>2</sup> (41%)	 6.7 ± 0.4 mm <sup>2</sup> (28%) *	 7.5 ± 0.5 mm <sup>2</sup> (30%) *
7 день	 12.3 ± 0.6 mm <sup>2</sup> (39%)	 6.9 ± 0.3 mm <sup>2</sup> (26%) *	 7.9 ± 0.4 mm <sup>2</sup> (29%) *
21 день	 9.3 ± 0.4 mm <sup>2</sup> (25%)	 2.5 ± 0.2 mm <sup>2</sup> (11%) * #	 3.9 ± 0.2 mm <sup>2</sup> (15%) *

**Рисунок 20.** Динамика развития ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крыс на протяжении 7-дневного курса введения препаратов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината «Ишемия + ЭМГПс» и аналог АКТГ «Ишемия + АКТГ<sub>4-7</sub>», а также на 21 сутки (после 14-дневного периода отмены препаратов). Фотографии срезов префронтальной коры головного мозга крыс выполнены в области с наибольшей площадью поражения коры (на уровне 4,2 мм от брегмы) (Рахипос, 1998). Окрашивание гематоксилином-эозином. Под каждой фотографией приведены значения площади повреждения в обоих полушариях, в скобках указана площадь повреждения в % от площади префронтальной коры. \* -  $p < 0.05$  по отношению к «Ишемия + NaCl 0,9%» в соответствующем временном периоде. # -  $p < 0.05$  по отношению «Ишемия + АКТГ<sub>4-7</sub>» в соответствующем временном периоде.

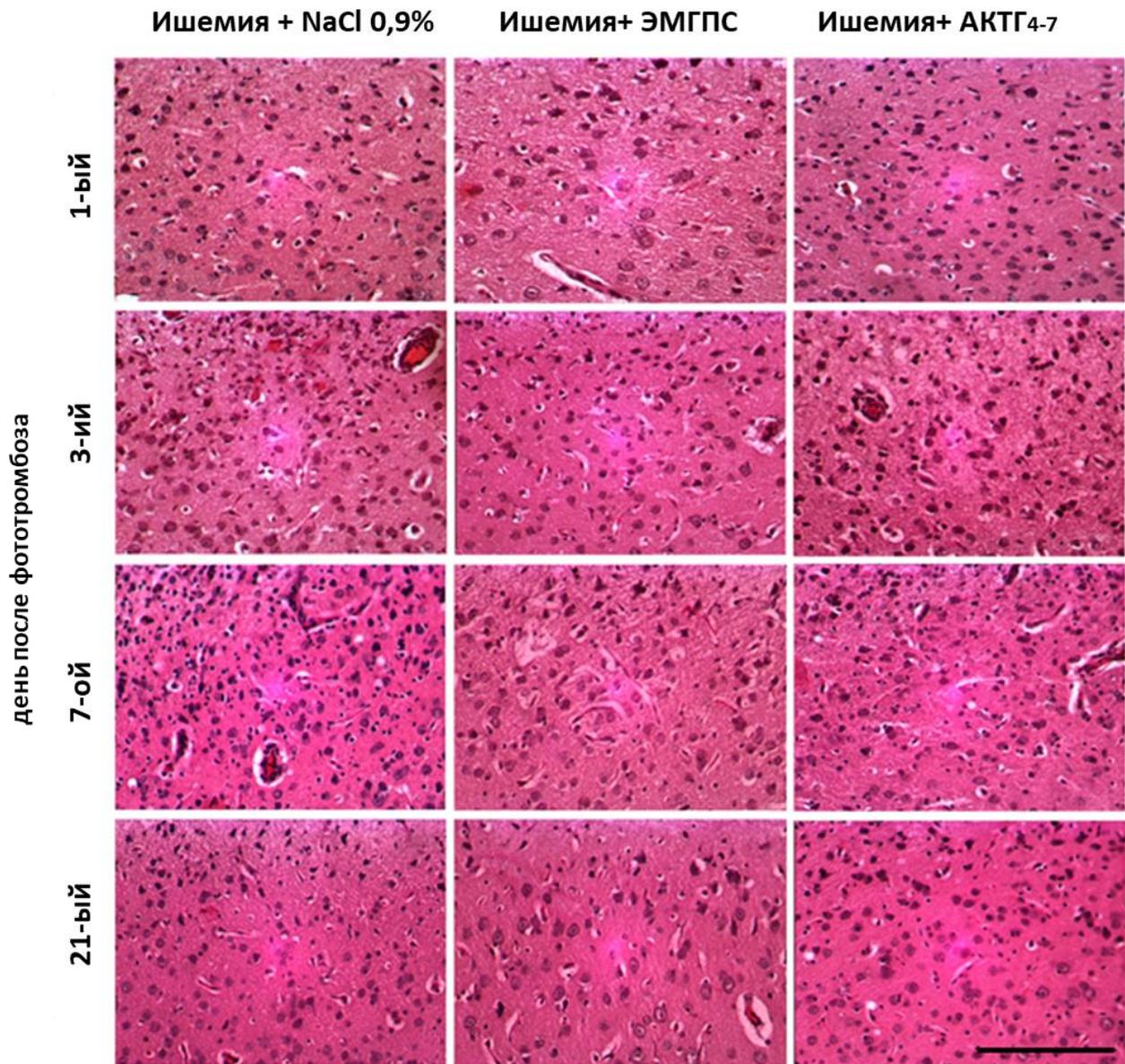
Морфометрический анализ срезов префронтальной коры (ПФК), окрашенных гематоксилином-эозином, показал, что после моделирования фототромбоза периинфарктная зона имеет неравномерное распределение вокруг очага ишемии. Наиболее протяженный центральный участок (до 1,5 мм) отмечается в области наибольшей толщины ядра инфаркта, менее утолщенные участки очага продолжаются истонченной перифокальной зоной (0,2-0,6 мм). Курсовое применение препаратов влияло на протяженность периинфарктной зоны с клеточными изменениями.

Спустя сутки после фототромбоза сосудов ПФК, протяженность поврежденной ткани в центральном участке составила  $734 \pm 42$  мкм, а в удаленных от центра очага участках –  $379 \pm 28$  мкм. Количество нейронов в периинфарктной зоне снижалось на 20% в сравнении с соответствующими участками ПФК в контрольной группе, в то время как количество макрофагов и нейтрофилов увеличивалось в 3 и 10 раз соответственно ( $P < 0.05$ ; рис. 21, рис. 22). При однократном введении Мексидола через

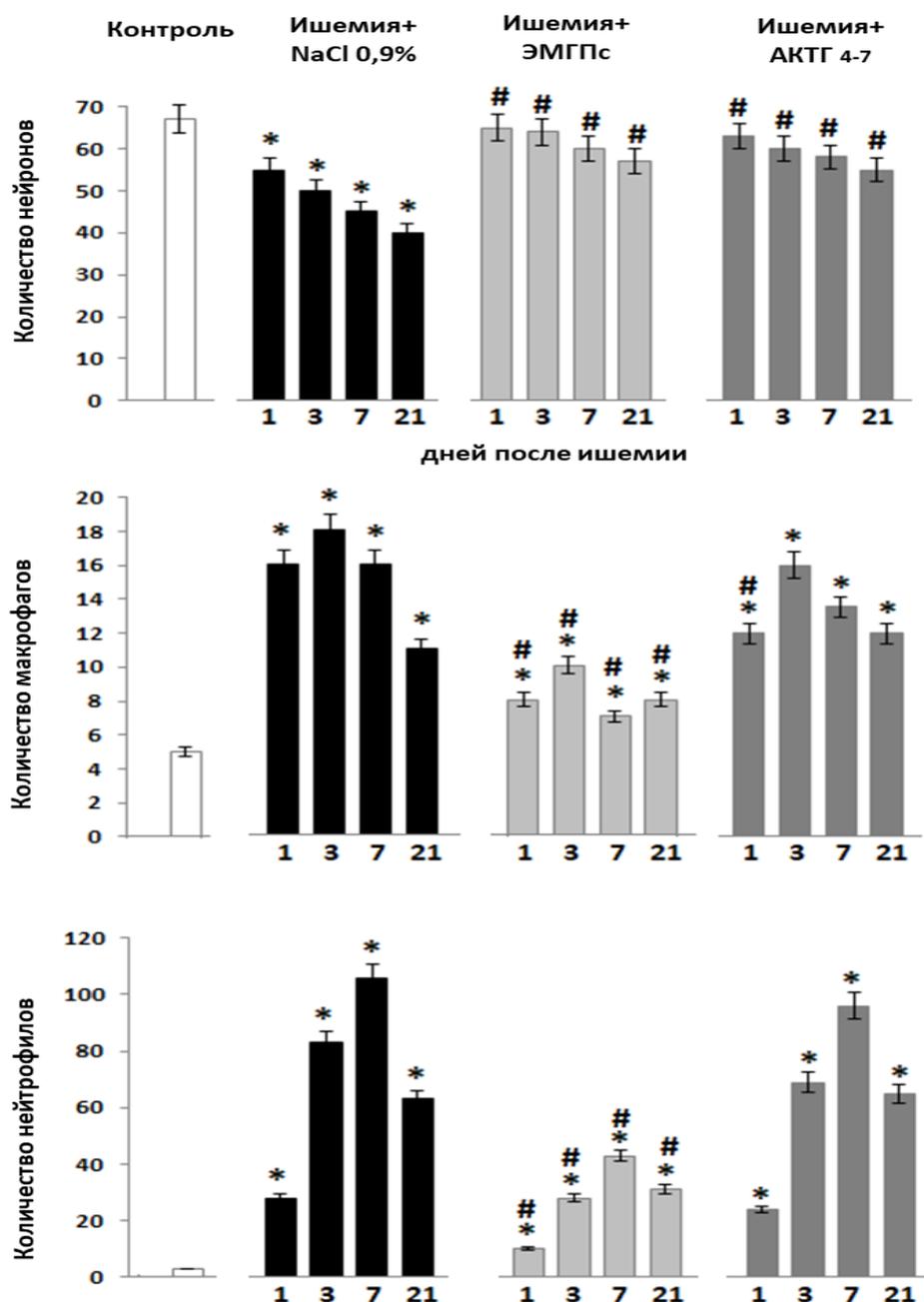
2 ч после фототромбоза протяженность зоны полутени, примыкающей к центральному и боковым участкам очага уменьшилась на 40% и 60% соответственно ( $P<0.05$ ), по сравнению с группой «Ишемия + NaCl0,9%», а относительно получавших Семакс – на 15% и 25% ( $p<0.05$ ). При однократном введении Мексидола количество макрофагов и нейтрофилов в перифокальной зоне было меньше в 2 и 3 раза ( $p<0.05$ ) соответственно, по сравнению с группой «Ишемия + NaCl0,9%», при введении Семакса – на 25% и 15% ( $P<0.05$ ; рис. 21, рис. 22).

Семидневный курс Мексидола сопровождался ограничением распространения зоны полутени и увеличением количества нейтрофилов на 20% ( $p<0.05$ ) по сравнению с 3-ми сутками, такой же курс Семакса сопровождался увеличением размеров пенумбры на 40 и 15% для центральных и удаленных от центра участков, соответственно, по сравнению с 3 сутками ( $p<0.05$ ) и нарастающей нейтрофильной инфильтрацией (на 40%;  $p<0.05$ ) (рис. 21, рис. 22). На 7 день после ишемии в группах «Ишемия+ЭМГПс» и «Ишемия+АКТГ<sub>4-7</sub>» протяженность пенумбры по сравнению с группой «Ишемия+NaCl0,9%» была меньше на 60% и на 30% соответственно ( $p<0.05$ ); количество нейронов в зоне полутени было выше на 30% ( $p<0.05$ ), макрофагов – ниже на 50% у получавших Мексидол и 25% у получавших Семакс, а нейтрофилов – ниже на 60% (Ишемия + ЭМГПс) ( $p<0.05$ ; рис. 21, рис. 22). Количество нейтрофилов для групп «Ишемия+NaCl0,9%» и «Ишемия+АКТГ<sub>4-7</sub>» не отличалось. На 21-й день после фототромбоза наблюдали сокращение размеров ткани ПФК с клеточными изменениями, примыкающей к очагу инфаркта на 40% ( $p<0.05$ ), уменьшение количества макрофагов на 30% ( $p<0.05$ ) и нейтрофилов на 40% ( $p<0.05$ ), количество нейронов не изменилось в сравнении с 7-м днем постишемического периода.

Через 14 дней после окончания 7-дневного курса Мексидола (21-й день после фототромбоза) протяженность зоны полутени была сокращена на 50%, количество нейронов и макрофагов не менялось, количество нейтрофилов было снижено на 20% по сравнению с 7 днем постишемического периода. На 14-й день после окончания курса Семакса, протяженность полутени была на 40% ( $p<0.05$ ) меньше относительно 7 дня после ишемии, количество нейронов и макрофагов не менялось, количество нейтрофилов было снижено на 30% в сравнении с 7 днем наблюдений. Протяженность зоны полутени на 70% ( $p<0.01$ ) была меньше в группе «Ишемия+ЭМГПс» и на 30% ( $p<0.05$ ) в группе «Ишемия+АКТГ<sub>4-7</sub>». Количество макрофагов и нейтрофилов было меньше на 30% и 50% ( $p<0.05$ ), соответственно, в группе «Ишемия + ЭМГПс» и не отличалось в группах «Ишемия+NaCl0,9%» и «Ишемия+АКТГ<sub>4-7</sub>» (рис. 21, рис. 22). Количество нейронов было выше на 40% ( $p<0.05$ ) в группах животных, получавших терапию по сравнению с крысами с фототромбозом без лечения.



**Рисунок 21.** Репрезентативные микрофотографии патоморфологических изменений в префронтальной коре в течение 21 дня после фототромбоза при 7-дневных курсах введения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) и аналога АКТГ<sub>4-7</sub>). Микрофотографии перинфарктной зоны (зона полутени). Окрасивание гематоксилин-эозином. Объектив x20. Маркер масштаба 100 мкм.



**Рисунок 22.** Влияние 7-дневных курсов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (ЭМГПс) и аналога АКТГ<sub>4-7</sub> на клеточный профиль перифокальной зоны на 1-е, 3-и, 7-е и 21-е сутки после фототромбоза сосудов префронтальной коры. Данные представлены в виде средних значений числа клеток получены при обсчете шести рандомизированных микрофотографий (изображения соответствовали площади перинфарктной зоны 0,1 мм<sup>2</sup>) в трех срезах у четырех крыс (M ± SEM; \* - p < 0,01; данные отличаются от контрольной группы; # - p < 0.01; данные отличаются от группы «Ишемия+NaCl0,9%»)

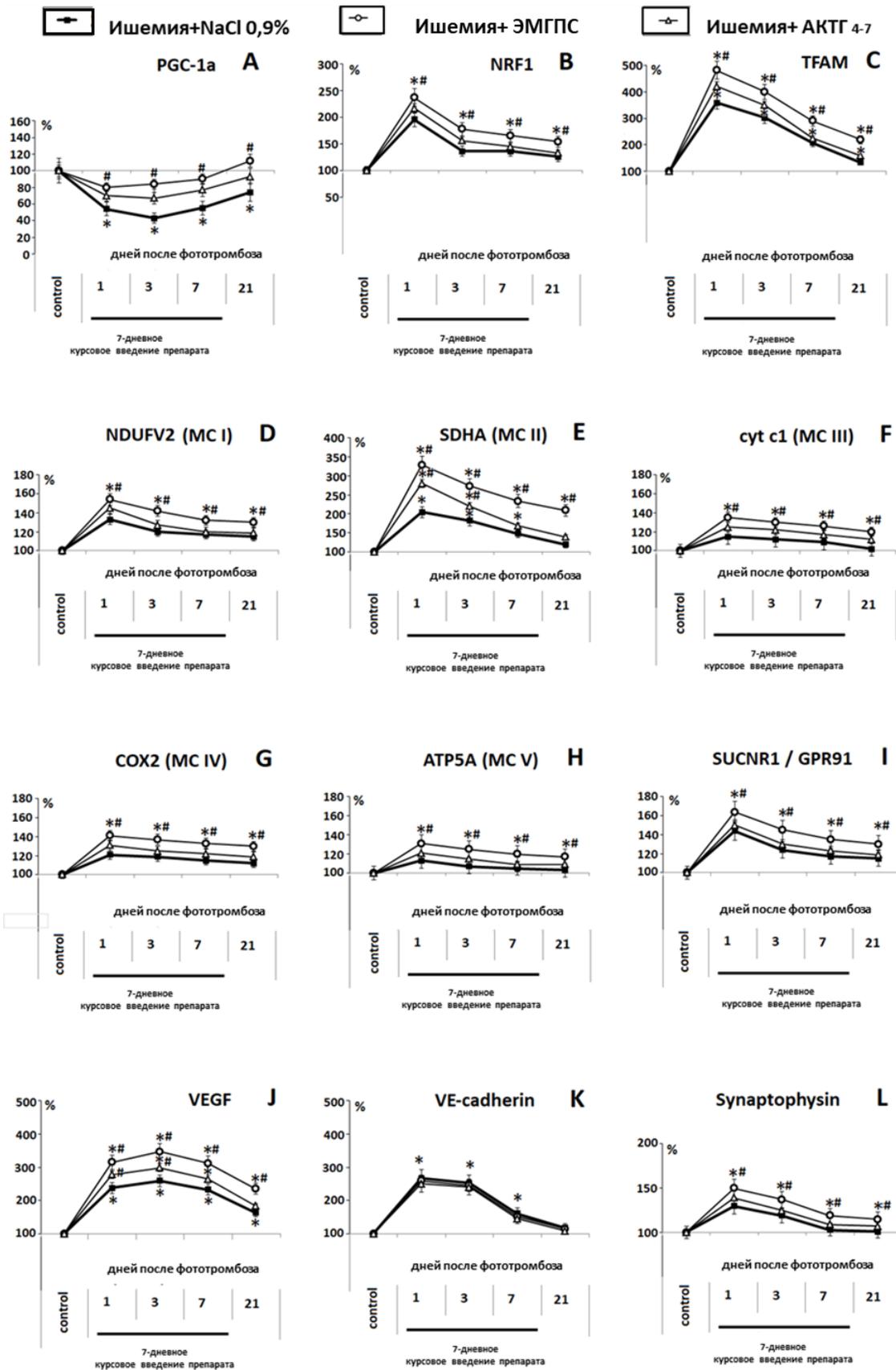
Таким образом, 7-дневные курсы применения Мексидола (ЭМГПс) и Семакса (АКТГ<sub>4-7</sub>) сопровождалось сохранением значительного количества нейронов в перинфарктной области в обеих группах. Наибольшей эффективностью обладал препарат Мексидол, что, по-видимому, может быть связано с выраженным ограничением инфильтрации пенумбры провоспалительными клетками, цитотоксическая активность которых потенцирует механизмы нейрональной гибели.

## **Влияние нейропротективной терапии на экспрессию и активность PGC-1 $\alpha$ в перинфарктной зоне**

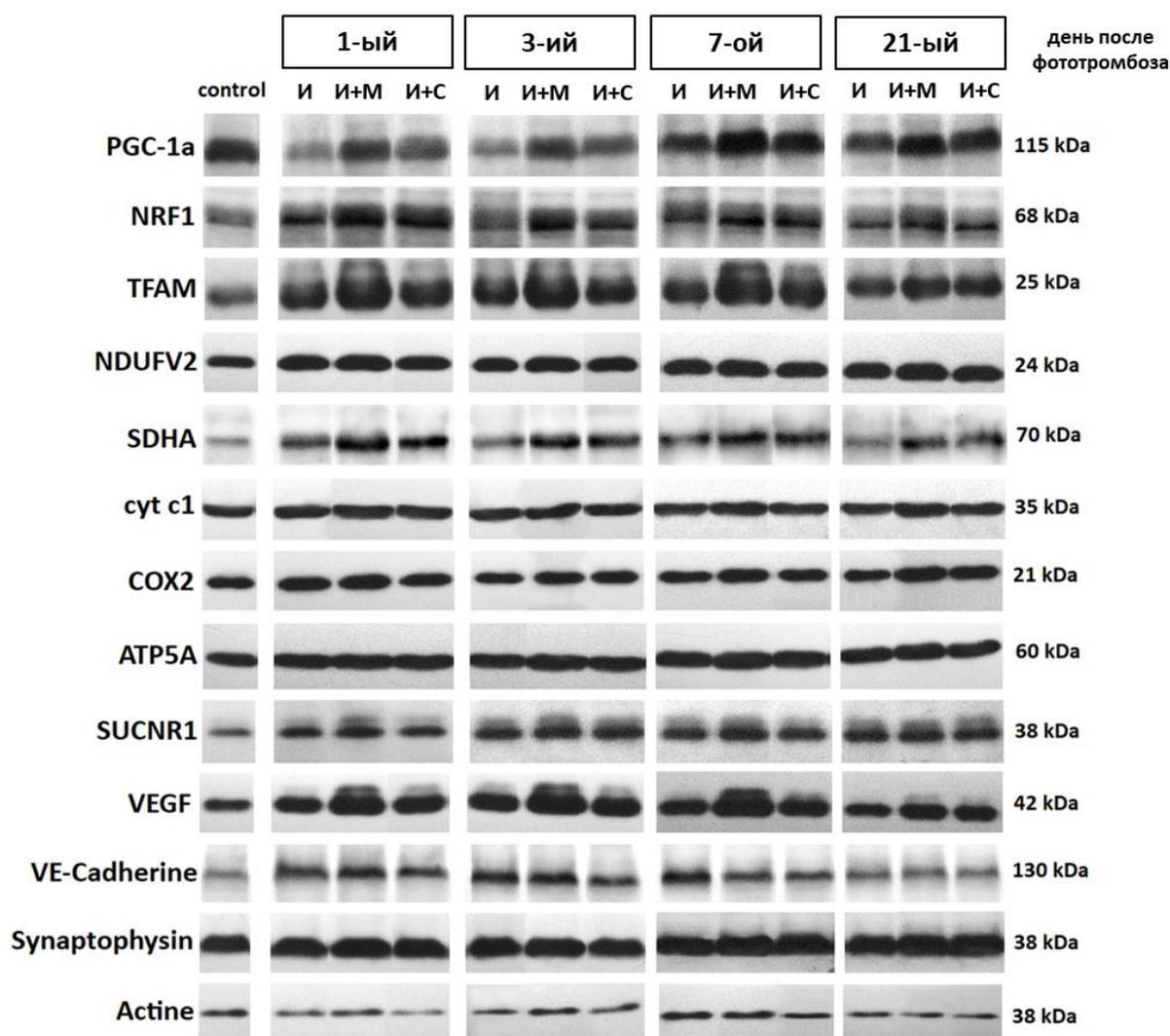
Показано, что фототромбоз префронтальной коры головного мозга крыс сопровождался снижением уровня белка PGC-1 $\alpha$  в цитоплазматическом экстракте ткани перинфарктной зоны на протяжении всего периода наблюдений (21 день после после ишемического повреждения) (рис. 23 А; рис. 24). Максимальное снижение PGC-1 $\alpha$  было выявлено через 24 ч и на 3-и сутки постишемического периода (50% по сравнению с контрольными крысами). Полученные данные могут быть следствием: 1 - уменьшения количества PGC-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов в зоне пенумбры, 2 - снижения синтеза PGC-1 $\alpha$  в сохранившихся нейронах пенумбры; 3 - транслокации активированного PGC-1 $\alpha$  в ядро нейронов и снижения его содержания в цитоплазме. Действительно, на первые сутки постишемического периода приходится пик активности PGC-1 $\alpha$ , о чем свидетельствует выраженная индукция PGC-1 $\alpha$ -зависимых белков (рис. 23 В-Н, J, L; рис. 24). Наиболее значительное увеличение содержания было отмечено для транскрипционных факторов NRF1 (200%;  $p < 0.01$ ), TFAM (350%;  $p < 0.01$ ), каталитических субъединиц субстратного участка дыхательной цепи NDUFV2 (140%;  $p < 0.05$ ) и SDHA (200%;  $p < 0.01$ ), VEGF (250%;  $p < 0.01$ ), SYP (130%;  $p < 0.05$ ), которые широко применяются в качестве маркеров активации PGC-1 $\alpha$  (Kelly, 2004). Для каталитических субъединиц цитохромного участка дыхательной цепи митохондрий (сyt c1, COX2) и АТФ-синтазы (АТР5А) увеличение содержания составило 20% ( $p < 0.05$ ; рис. 23 F, G, H; рис. 24). Активность PGC-1 $\alpha$  увеличивалась сопряженно с увеличением экспрессии сукцинатного рецептора SUCNR1 (рис. 23 I; рис. 24).

К 7-му и 21-му дню постишемического периода содержание белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$  поступательно снижалось, достигая к концу наблюдений уровня контрольных животных (рис. 23; рис. 24). В этот же период уровень PGC-1 $\alpha$  в цитозольном экстракте пенумбры увеличивался на 10% (7 день) и 20% ( $p < 0.05$ ; 21 день), что может указывать, в условиях снижения активации PGC-1 $\alpha$ , на ослабление его транслокации в ядре нейронов.

Введение Мексидола через 2 ч после фототромбоза, сопровождалось через 24 ч поддержанием экспрессии PGC-1 $\alpha$  в ткани пенумбры на уровне, сопоставимом с контролем, превышающим экспрессию PGC-1 $\alpha$  в группе «Ишемия + NaCl 0,9%» на 30% ( $p < 0.01$ ; рис. 23 А; рис. 24). Эффект поддержания экспрессии PGC-1 $\alpha$  на контрольном уровне сохранялся на протяжении 21 суток постишемического периода (рис. 23 А; рис. 24).



**Рисунок 23.** Влияние 7-дневного курса ЭМГПС (Мексидола, 100 мг/кг, в/б, ежедневно) и аналога АКТГ<sub>4-7</sub> (Семакса, 25 мкг/кг, и/н, ежедневно) на экспрессию PGC-1 $\alpha$  и белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$  в зоне пенумбры на протяжении 21 дня постишемического периода. \* - данные отличаются от группы «контроль» ( $p < 0.01$ ), # - данные отличаются от группы «Ишемия + NaCl 0,9%» ( $p < 0.01$ )



**Рисунок 24.** Влияние 7-дневного курса ЭМГПс (Мексидол, 100 мг/кг, в/б, ежедневно) и аналога АКГГ<sub>4-7</sub> (Семакса, 25 мкг/кг, и/н, ежедневно) на экспрессию PGC-1α и белков-маркеров активности PGC-1α в зоне пенумбры на протяжении 21 дня постинсультного периода. Фотографии репрезентативных иммуноблотов

Курсовое введение Мексидола сопровождалось увеличением содержания в ткани перифокальной зоны PGC-1α-зависимых белков, причем уровень их экспрессии значимо превышал выявленный для группы «Ишемия + NaCl0,9%» (рис.23, рис.24). Наиболее выраженным оказалось влияние Мексидола на активность PGC-1α на протяжении 7 дней курса, когда уровень экспрессии NRF1 был выше на 40% ( $p < 0.01$ ) по сравнению с группой «Ишемия+NaCl0,9%», TFAM – на 100% ( $p < 0.01$ ), NDUFV2 – на 30% ( $p < 0.05$ ), SDHA – на 100% ( $p < 0.01$ ), VEGF – на 80% ( $p < 0.01$ ), SYP - на 20% ( $p < 0.05$ ). Уровень экспрессии ферментов цитохромного участка дыхательной цепи (cyt c1, COX2) и ATP5A также был достоверно выше ( $p < 0.05$ ) в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%».

Введение Мексидола сопровождалось индукцией и активацией PGC-1α не только на протяжении 7-дневного курса, но и спустя 14 дней после отмены препарата и было сопряжено с увеличением уровня экспрессии сукцинатного рецептора SUCNR1 (рис. 23 I; рис. 24).

Курсовое введение Семакса ишемизированным животным в течение 7 дней также, как в случае с Мексидолом сопровождалось поддержанием экспрессии PGC-1 $\alpha$  на уровне достоверно более высоком (на 20%,  $p < 0.05$ ) по сравнению с группой «Ишемия+NaCl0,9%» в течение 21 дня постишемического периода (рис 23А, рис. 24). Активность PGC-1 $\alpha$ , оцениваемая по уровню экспрессии PGC-1 $\alpha$ -зависимых белков, также была достоверно выше в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%», однако менее выражена в сравнении с группой, получавшей Мексидол. Эффекты Семакса на активность PGC-1 $\alpha$  проявлялись в течение 3 дней постишемического периода: уровень экспрессии NRF1 был выше на 20% ( $p < 0,05$ ), TFAM – на 50% ( $p < 0,01$ ), NDUFB2 – на 20% ( $p < 0,05$ ), SDHA – на 50% ( $p < 0,01$ ), VEGF – на 40% ( $p < 0,01$ ) в сравнении с ишемическими крысами (рис. 23, рис. 24).

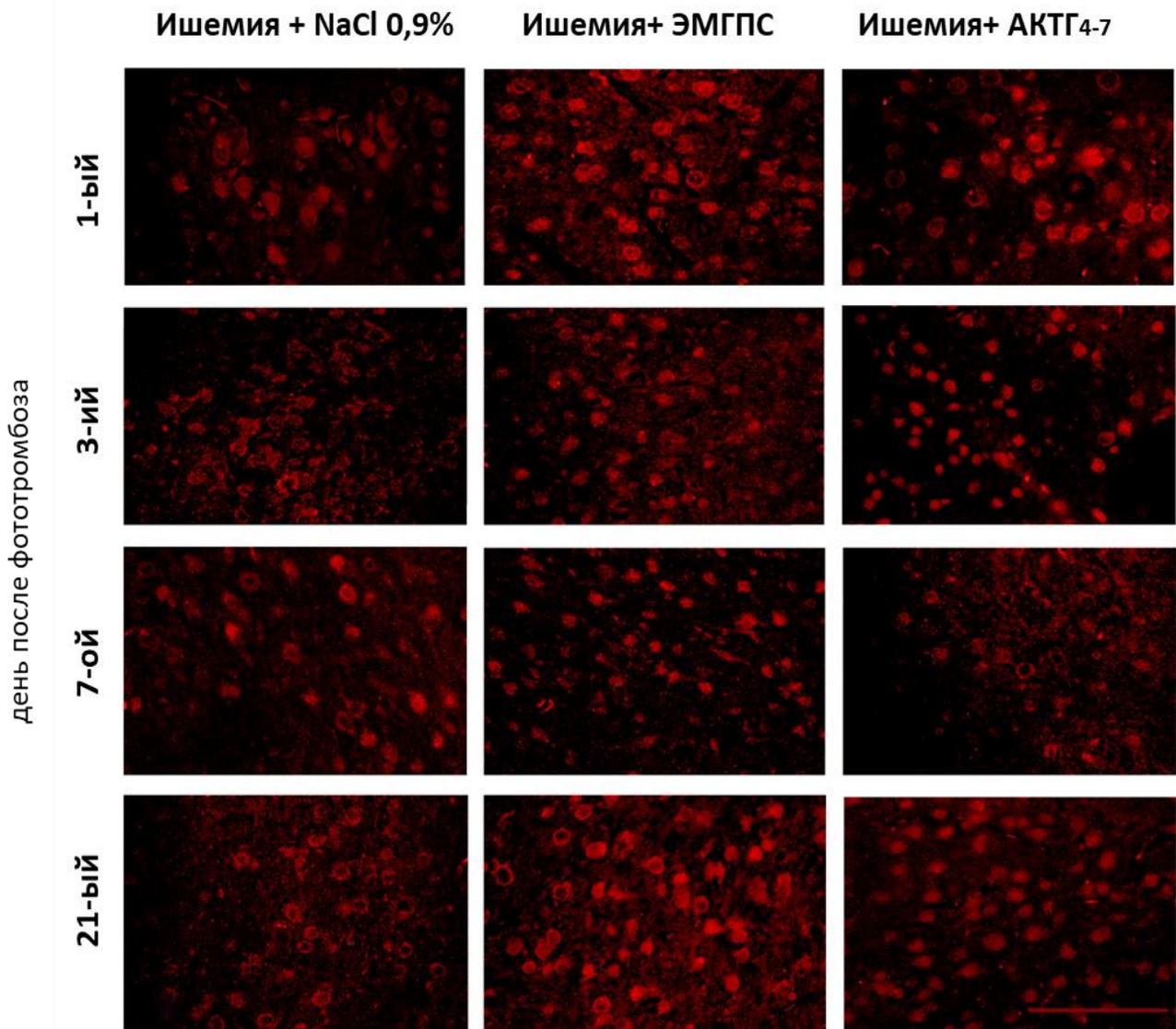
В исследовании также оценивалась динамика экспрессии VE-кадгерина (VEC), вовлеченного в ангиогенез, стабилизацию и созревание вновь образующихся сосудов (Morini et al., 2018; Vestweber, 2008). Экспрессия белка не является PGC-1 $\alpha$ -зависимой. Примененные препараты не влияли на экспрессию VE-кадгерина.

Таким образом, показано, что ишемическое повреждение коры головного мозга сопряжено с устойчивой супрессией PGC-1 $\alpha$  в перифокальной зоне, что прежде всего может быть связано с прогрессирующей потерей PGC-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов на протяжении 21 дня постишемического периода. Применение 7-дневных курсов Мексидола и Семакса способствовало сохранению нейронов в зоне ишемической полутени и поддержанию уровня экспрессии PGC-1 $\alpha$ , сопоставимого с контролем. На фоне увеличения содержания PGC-1 $\alpha$  в перинфарктной зоне регистрировали значимо более высокий в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%» уровень белков-маркеров активности PGC-1 $\alpha$ . Применение терапевтических доз Мексидола и Семакса показало больший нейропротективный потенциал сукцинатсодержащего препарата Мексидол, что, вероятно, сопряжено с индукцией сукцинатного рецептора, имеющего важное значение в реализации механизмов толерантности мозга к ишемии (Hamel, 2014).

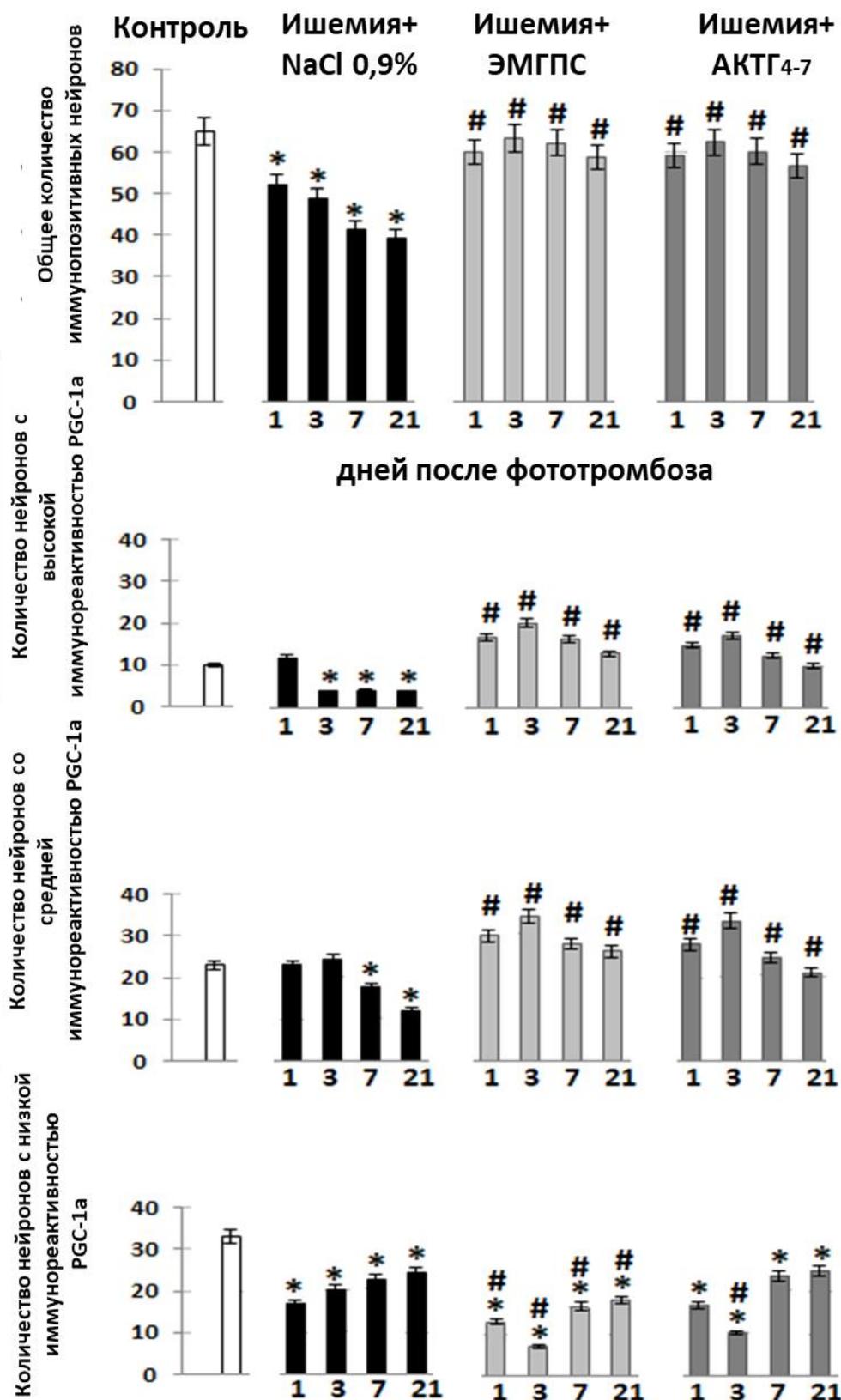
### **Влияние нейропротекторной терапии на экспрессию и ядерную транслокацию PGC-1 $\alpha$ в нейронах перинфарктной зоны**

С целью оценки уровня экспрессии PGC-1 $\alpha$  в индивидуальных нейронах и содержание PGC-1 $\alpha$  в ядрах нейронов (отражает активацию PGC-1 $\alpha$ ) было выполнено иммуногистохимическое окрашивание нейронов пенумбры. В срезах ПФК контрольных крыс количество нейронов с высокой и средней ядерной PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью составляло 15% и 35%, соответственно, от общего количества нейронов (обсчет производили в участках, соответствующих расположению пенумбры, на площади среза 0,1 мм<sup>2</sup>) (рис. 25, рис. 26). Фототромбоз сосудов ПФК вызывал через 24 ч снижение общего количества PGC-1 $\alpha$ -иммунопозитивных нейронов на 20% ( $p < 0.05$ ), при этом количество нейронов с высокой и средней PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью не менялось, но их доля в общем количестве PGC-1 $\alpha$ -

экспрессирующих нейронов увеличилась на 7% и 10%, соответственно. Выявленные изменения в количественном соотношении нейронов, различающихся по уровню экспрессии PGC-1 $\alpha$ , свидетельствуют о ранней (в течение 24 ч) постишемической гибели нейронов с низкой PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью, потенциально наименее резистентных к ишемии.



**Рисунок 25.** Влияние 7-дневных курсов ЭМГПС (100 мг/кг, в/б, ежедневно) и аналога АКТГ<sub>4-7</sub> (25 мкг/кг, и/н, ежедневно) на экспрессию и ядерно-цитозольную локализацию PGC-1 $\alpha$  в нейронах пенумбры на протяжении 21 дня постишемического периода. Репрезентативные микрофотографии иммуногистохимически окрашенных срезов префронтальной коры головного мозга крыс. Объектив х20. Маркер масштаба 100 мкм.



**Рисунок 26.** Влияние 7-дневных курсов ЭМГПС (Мексидола) и аналога АКТГ<sub>4-7</sub> (Семакс) на уровень экспрессии и ядерную транслокацию PGC-1α в индивидуальных нейронах через 1-е, 3-и, 7-е и 21-е сутки после фототромбоза сосудов префронтальной коры (ПФК). Средние величины числа клеток получены при анализе шести рандомизированных микрофотографий (изображения соответствовали площади пенумбры 0,1 мм<sup>2</sup>) в трех срезах у четырех крыс. Примечание \* -  $p < 0,01$ ; данные отличаются от группы «контроль»; # -  $p < 0,01$ .

Однократное введение Мексидола и Семакса через 2 ч после фототромбоза способствовало сохранению в течение 24 ч постишемического периода количества PGC-1 $\alpha$ -иммунопозитивных нейронов пенумбры на уровне сопоставимом с контролем. При этом количество нейронов с высокой и средней ядерной PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью в группе «Ишемия + ЭМГПс» увеличивалось в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%» на 40% и 30% ( $p<0.05$ ), а в группе «Ишемия+АКТГ<sub>4-7</sub>» на 25% и 20% ( $p<0.05$ ) (рис. 25, рис. 26). Таким образом, применение обоих препаратов не только способствовало поддержанию общего количества PGC-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов в пенумбре на уровне контроля, но и значимому увеличению доли нейронов с высоким и средним уровнем ядерной PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивности, т.е. активации PGC-1 $\alpha$ .

Через 3 дня после экспериментального инсульта, общее количество PGC-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов уменьшилось на 10%, а нейронов с высокой ядерной PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью на 70% ( $p<0.05$ ) по сравнению с первыми сутками после ишемии. Трехдневные курсы Мексидола и Семакса значимо не влияли на общее количество PGC-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов, нейронов с высокой и средней ядерной PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью по сравнению с однократным введением препаратов, однако их количество относительно группы «Ишемия+NaCl0,9%» было выше на 30%, в 4,0 и 1,4 раза, соответственно ( $p<0.05$ ; рис. 25, рис. 26). Через 7 и 21 сутки после фототромбоза количество PGC-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов и нейронов со средней ядерной PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью прогрессивно уменьшалось по сравнению с 1-ми сутками постишемического периода (рис. 25, рис. 26). Поступательное снижение (от 3-го к 21-м суткам) у ишемизированных животных уровня ядерной активированной формы PGC-1 $\alpha$ , опосредующего множественные нейтропротекторные механизмы, было сопряжено с прогрессирующей гибелью нейронов в пенумбре, наблюдаемой на протяжении 21 дня после экспериментального инсульта. Курсовое введение Мексидола и Семакса сопровождалось поддержанием в пенумбре значимо большего количества нейронов с высокой ядерной PGC-1 $\alpha$ -иммунореактивностью (в 3 раза у Мексидола и 2,5 раза у Семакса,  $p<0,05$ ) по сравнению с группой ишемизированных животных без лечения («Ишемия+NaCl0,9%») как на 7-й, так и 21-й день после фототромбоза. Общее количество PGC-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов на 21-й день наблюдений также было достоверно выше (в 1,5 раза с Мексидолом и 1,4 раза с Семаксом;  $p<0.05$ ) относительно группы «Ишемия+NaCl0,9%» (рис. 25, рис. 26).

Таким образом, курсовое применение 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (Мексидол) и аналога АКТГ<sub>4-7</sub> (Семакс) у животных с экспериментальным инсультом стимулировало экспрессию и ядерную транслокацию (активацию) PGC-1 $\alpha$ , что повышало выживаемость нейронов пенумбры.

### Выводы

1. В развитии ишемического повреждения ткани мозга выявлен единый триггерный механизм дизрегуляции внутриклеточных нейропротекторных систем – устойчивая супрессия и деактивация транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  – ключевого координатора биогенеза митохондрий и митохондриальной динамики, антиоксидантных систем, ангио- и синаптогенеза, противовоспалительной трансформации иммуноцитов.
2. Для оценки активности PGC-1 $\alpha$  наиболее адекватным и специфичным подходом является определение экспрессии PGC-1 $\alpha$ -зависимых белков-маркеров митохондриогенеза: транскрипционных факторов TFAM, NRF1, каталитических субъединиц субстратного участка дыхательной цепи NDUFV2, SDHA.
3. Деактивация PGC-1 $\alpha$  сопровождается развитием острой воспалительной реакции, массивной инфильтрации пенумбры макрофагами, поражением микрососудистого русла, вторичной ишемизацией, прогрессией пенумбры и вторичной постишемической гибелью нейронов.
4. Фармакологические препараты с экспериментально и клинически подтвержденным плейотропным нейропротекторным действием (синтетический аналог АКТГ<sub>4-7</sub> и ЭМГП сукцинат) реализуют эффекты посредством положительной модуляции транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ .
5. Положительная модуляция PGC-1 $\alpha$  при курсовом введении синтетического аналога АКТГ<sub>4-7</sub> и ЭМГП сукцината сопровождалась активацией внутриклеточных нейропротекторных систем (биогенез митохондрий), торможением воспалительной реакции (противовоспалительная поляризация иммуноцитов) и уменьшением неврологического дефицита.
6. Эффективная индукция/активация PGC-1 $\alpha$  в периинфарктной зоне может осуществляться через стимуляцию специфических рецепторов (MCRs, SUCNR1), экспрессируемых всеми клеточными популяциями ткани мозга (нейронами, астроцитами, микроглиоцитами, олигодендроцитами).
7. Сукцинатный рецептор SUCNR1 характеризуется уникальной суперэкспрессией при ишемии, что определяет высокий потенциал сукцинатсодержащих препаратов (в исследовании ЭМГП сукцинат) как положительных модуляторов PGC-1 $\alpha$  в раннем и отсроченном постишемическом периоде.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рецензируемых ВАК

1. Романова Г.А., Силачев Д.Н., **Шакова Ф.М.**, Квашенникова Ю.Н., Викторов И.В., Шрам С.М., Мясоедов Л.Ф. Нейропротективное и антиамнестическое действие Семакса при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2006. - Т. 142. - № 12. - С. 618-621.
2. Романова Г.А., Силачев Д.Н., **Шакова Ф.М.**, Квашенникова Ю.Н. Особенности обучения в водном лабиринте Морриса у крыс с ишемическим повреждением префронтальной области коры головного мозга // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2008. - № 4. - С. 19-21.
3. Силачев Д.Н., Шрам С.И., **Шакова Ф.М.**, Романова Г.А., Мясоедов Н.Ф. Формирование пространственной памяти у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга; эффекты синтетического аналога АКТГ<sub>4,7</sub> // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. - 2008. - Т. 58. - № 4. - С. 458-466.
4. Романова Г.А., **Шакова Ф.М.**, Квашенникова Ю.Н., Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату на память крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга // Патогенез. - 2010. - Т. 8. - № 1. - С. 56.
5. Давыдова Т.В., Романова Г.А., Фомина В.Г., Ветрилэ Л.А., **Шакова Ф.М.** Антитела к глутамату – возможные нейропротекторы при нейродегенеративной патологии головного мозга // Патогенез. - 2010. - Т. 8. - № 1. - С. 19-22.
6. Середенин С.Б., Романова Г.А., Гудашева Т.А., **Шакова Ф.М.**, Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Антипова Т.А. Нейропротективное и антиамнестическое действие дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга // Бюлл. эксп. биол. мед. - 2010. - Т. 150. - № 10. - С. 406-409.
7. Мухина И.В., Бугрова М.Л., Романова Г.А., **Шакова Ф.М.**, Продиус П.А. Ультраструктурные изменения контрлатерального участка перифокальной зоны локального ишемического очага, вызванного фотоиндуцированным тромбозом префронтальной коры мозга крыс // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2010. - № 4. - С. 43-48.
8. Романова Г.А., Квашенникова Ю.Н., **Шакова Ф.М.**, Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату на содержание нейротрансмиттерных аминокислот в структурах мозга крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры // Бюлл. эксп. биол. мед. - 2012. - Т. 153. - № 1. - С. 17-20.
9. Гудашева Т.А., Романова Г.А., **Шакова Ф.М.**, Котельникова С.О., Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Середенин С.Б. Нейропротективное и антиамнестическое действие дипептидного миметика человеческого фактора роста нервов ГК-2Н при экспериментальном инфаркте коры большого мозга // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2012. - Т. 75. - № 10. - С. 12-15.
10. Романова Г.А., **Шакова Ф.М.**, Давыдова Т.В. Сравнение нейропротективного действия антител к глутамату и лекарственного препарата Семакс при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2012. - Т. 56. - № 3. - С. 62-67.
11. **Шакова Ф.М.**, Давыдова Т.В., Романова Г.А. Влияние антител к глутамату на сохранение памяти и уровень нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга крыс при ишемическом повреждении префронтальной коры // Патогенез. - 2013. - Т. 11. - № 3. - С. 49-53.
12. **Шакова Ф.М.**, Клодт П., Кудрин В.С., Давыдова Т.В., Романова Г.А. Защитная роль антител к глутамату при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры мозга крыс // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2013. - Т. 57. - № 3. - С. 19-22
13. Романова Г.А., **Шакова Ф.М.**, Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Черемных А.М., Калинина Т.И., Юрин В.Л. Нейропротективное и антиамнестическое действие

производных эритропоэтина при экспериментальном ишемическом повреждении коры головного мозга // Бюлл. эксп. биол. мед. - 2014. - Т. 158. - № 9. - С. 299-302.

14. **Шакова Ф.М.**, Клодт П.М., Кудрин В.С., Давыдова Т.В., Романова Г.А. Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в структурах мозга крыс после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2014. - Т. 58. - № 1. - С. 18-23.
15. **Шакова Ф.М.**, Калинина Т.И., Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Юрин В.Л., Романова Г.А. Сравнение нейропротективных эффектов производных эритропоэтина при разных способах введения на модели двустороннего фокального ишемического повреждения префронтальной коры мозга крысы // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2015. - Т. 59. - № 3. - С. 28-33.
16. **Шакова Ф.М.**, Калинина Т.И., Гуляев М.В., Черемных А.М., Юрин В.Л., Романова Г.А. Нейропротективный и антиамнестический эффекты мутантных молекул эритропоэтина на модели фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крысы // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2016. - Т. 60. - № 4. - С. 34-38
17. **Shakova F.M.**, Zakharova I.A., Romanova G.A., Morozov S.G., Kalinina T.I., Yurin V.L. A comparison of the anti-amnestic effects of erythropoietin derivatives and their mutant forms on the level of S100B protein in the serum of rats with ischemic damage to the prefrontal cortex // *Biotecnologia Aplicada*. - 2017. - V. 34. - № 2. - P. 2201-2204.
18. **Шакова Ф.М.**, Кирова Ю.И., Романова Г.А. Влияние Семакса на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий мозга при экспериментальном двустороннем фотохимическом ишемическом повреждении префронтальной коры // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2018. - Т. 62. - № 4. - С. 257-260.
19. **Шакова Ф.М.**, Калинина Т.И., Гуляев М.В., Романова Г.А. Нейропротективный и антиамнестический эффекты комбинированной терапии при ишемическом повреждении префронтальной коры в эксперименте // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2018. - Т. 62. - № 2. - С. 39-45.
20. Кирова Ю.И., **Шакова Ф.М.**, Германова Э.Л., Романова Г.А., Воронина Т.А. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2020. - Т. 120, № 1. - С. 62-69.
21. **Шакова Ф.М.**, Кирова Ю.И., Романова Г.А. Современный этап нейропротекции – развитие митохондриально-направленных подходов // Патогенез. – 2020. - Т. 18, №2. - С. 4–19
22. **Shakova F.M.**, Kirova Y.I., Silachev D.N., Romanova G.A., Morozov S.G. Protective effects of PGC-1 $\alpha$  activators on ischemic stroke in a rat model of photochemically induced thrombosis // *Brain Sci*. - 2021, Vol. 11. – P. 325. <https://doi.org/10.3390/brainsci11030325>

#### Публикации в журналах, индексируемых в базе данных РИНЦ

23. Романова Г.А., **Шакова Ф.М.** Пептидергическая регуляция когнитивных расстройств при фокальной ишемии префронтальной коры головного мозга крыс // Патогенез. - 2008. - Т. 6. - № 4. - С. 49.
24. Константинова Н.Б., **Шакова Ф.М.** Морфологическое изучение регенерации префронтальной зоны коры головного мозга крыс // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2008. - № 6. - С. 209.
25. Романова Г.А., **Шакова Ф.М.**, Квашенникова Ю.Н., Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату на память крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга // Патогенез. - 2010. - Т. 8. - № 1. - С. 56
26. Романова Г.А., Давыдова Т.В., **Шакова Ф.М.**, Квашенникова Ю.Н. Нейропротективное действие антител к глутамату при ишемическом очаговом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс // Патогенез. - 2011. - Т. 3. - С. 56

27. **Шакова Ф.М.**, Романова Г.А., Ветрилэ Л.А. Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату на содержание возбуждающих аминокислот в структурах мозга крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры // *Нейроиммунология*, - 2013. - Т. 11. - №1-2. - С. 142
28. **Шакова Ф.М.**, Ветрилэ Л.А. Давыдова Т.В., Романова Г.А. Нейропротективная роль антител к глутамату при очаговой ишемии префронтальной коры головного мозга крыс // *Патогенез*. - 2014. - Т. 3. - С. 73-74
29. Кирова Ю.И., **Шакова Ф.М.**, Германова Э.Л., Романова Г.А. Сукцинат/SUCNR1 вовлекается в индукцию церебрального митохондриогенеза // В сборнике: *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Институт биофизики клетки Российской академии наук*. - 2019. - С. 802-809.

#### Материалы в журналах и сборниках конференций

30. Romanova G.A., Davydova T., **Shakova F.M.** The effect of glutamate antibodies on the memory of rats with experimental damage to the prefrontal cortex // *European Neuropsychopharmacology*. - 2011. - V. 21. - № S2. - P. S117.
31. Romanova G.A., **Shakova F.M.** Behavioural and morphological disturbances induced by bilateral photochemical thrombosis of prefrontal cortex in rats // 3d International Interdisciplinary Conference on «Modern problems in systemic regulation of physiological functions». - October 1-8, 2013, Limassol, Cyprus. - P. 119
32. Romanova G.A., **Shakova F.M.**, Kalinina T.I., Yurin V.L. The neuroprotective and anti-amnestic effects of carbamylated erythropoietin derivatives in ischemic brain injury. *European Neuropsychopharmacology*. - October 2014. – V. 24.- S.2.- P.S221.
33. Калинина Т.И., Черемных А.М., Юрин В.Л., Романова Г.А., **Шакова Ф.М.** Нейропротективный эффект карбамилированного эритропоэтина и его производных. VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» // 17-20 марта 2015, Москва. Сборник тезисов. - С. 114-116.
34. **Shakova F.M.**, Romanova G.A, Kalinina T.I. The neuroprotective effect of carbamylated erythropoietin derivatives on model bilateral photochemical thrombosis of prefrontal cortex in rats // *European Behavioural Pharmacology Society Meeting*. - September 12-15, 2015 Verona, Italy. Book of abstracts. - P. 31
35. Романова Г.А., **Шакова Ф.М.**, Калинина Т.И., Юрин В.Л. На модели очаговой ишемии коры головного мозга крыс – коррекция функциональных расстройств с помощью производных эритропоэтина // XI Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». - 2-12 июня 2015, Судак, Крым. Сборник тезисов. - С. 329
36. **Шакова Ф.М.**, Романова Г.А. Нейропротективные эффекты активаторов PGC-1 $\alpha$  при экспериментальном ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга // Сборник тезисов III Объединенного научного форума, включающего VII Съезд физиологов, VII Съезд биохимиков России и X Российский симпозиум «Белки и пептиды». – 2021. - С.16
37. **Shakova F.**, Kirova Y., Germanova E., Romanova G. The Role of Ethylmethylhydroxypyridine Succinate in the Induction of PGC-1 $\alpha$  in Experimental Ischemic Damage of the Prefrontal Cortex // 12 Feb 2020 *Stroke*. – V. 51. – S.1. - Abstract WP154.
38. **Шакова Ф.М.**, Кирова Ю.И., Романова Г.А. Исследование механизмов мультитаргетных эффектов нейропротекторов на модели фокальной ишемии головного мозга // *Материалы XVI Международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии»*, 3-13 июня 2020 г., Судак, Крым, Россия. - С. 523-524.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 5-ОТ** - 5-окситриптамин
- 5-ОИУК** - 5-оксииндолуксусная кислота
- АКТГ** – адренотропный гормон
- АТ** – ГЛУ – антитела к глутамату
- ГАМК** – гамма-амино-масляная кислота
- ГК-2h**- гексаметилендиамид бис-N-моносукцинилглутамиллизин
- ГЛУ** – глутамат
- ГЭБ** – гематоэнцефалический барьер
- ДА** - дофамин
- ДОФУК** - 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота
- ДОФУК/ДА** - 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота/дофамин
- ИР** – иммунореактивность
- ПФК** – префронтальная кора головного мозга
- СДГ** - сукцинатдегидрогеназа
- ЦНС** – центральная нервная система
- СОХ2** - cytochrome c oxidase subunit II; цитохром с оксидазы II субъединица
- cyt b** - cytochrome b; цитохром b
- ERR** – estrogen-related receptor; белок, родственник рецептору эстрогена
- NDUFV2** - NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2; НАДН дегидрогеназы флавопротеин 2
- NeuN** – neuronal nuclear protein, нейрональный ядерный белок
- NRF** – nuclear respiratory factor; ядерный респираторный фактор
- PGC-1 $\alpha$**  – peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; коактиватор 1 альфа гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом; транскрипционный коактиватор
- PPAR** – proliferator peroxisome activated receptor; рецептор, активируемый пролифератором пероксисом
- SDHA** - a flavochrome subunit of succinate dehydrogenase; флавиновая субъединица А сукцинатдегидрогеназы
- Sp1** – specificity protein 1; фактор транскрипции человека
- SUCNR1** – succinate receptor 1; сукцинатный рецептор 1
- SYP** – synaptophysin; синаптофизин
- TFAM** - mitochondrial transcription factor A; митохондриальный транскрипционный фактор А
- TGF $\beta$ 1** – трансформирующий фактор роста бета
- VEC** – VE-cadherin; vascular endothelial cadherin; VE-кадгерин
- VEGF** – vascular endothelial growth factor; фактор роста эндотелия сосудов