

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»

На правах рукописи

Шакова Фатимат Мухамедовна

МЕХАНИЗМЫ ДИЗРЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ
НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫХ СИСТЕМ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ
ПОВРЕЖДЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

(экспериментальное исследование)

3.3.3 Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Романова Галина Александровна

Москва - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность исследования	5
Степень разработанности темы	6
Цель исследования	8
Задачи исследования	8
Научная новизна исследования	8
Научно-практическая значимость работы	9
Методология и методы исследования	9
Положения, выносимые на защиту	13
Личный вклад автора в проведенное исследование	14
Степень достоверности результатов исследования	14
Апробация результатов исследования	15
Публикации по теме диссертации	15
Структура и объем диссертации	15
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Ишемический инсульт. Определение понятия, этиология, эпидемиология	16
1.2 Современные представления о патогенезе ишемического инсульта	18
1.2.1 Основы дизрегуляции внутриклеточных систем при ишемии	18
1.2.2 Клеточные реакции, связанные с острой ишемией головного мозга	23
1.2.2.1 Глутаматная эксайтотоксичность	27
1.2.2.2 Окислительный стресс	29
1.2.2.3 Перекисное окисление липидов	32
1.2.2.4 Воспаление	32
1.2.2.5 Дисфункция гематоэнцефалического барьера	33
1.2.2.6 Лейкоцитарная инфильтрация	34
1.2.3 Концепция нейроваскулярной единицы	36
1.2.3.1 Регулирование ГЭБ при ишемии	38
1.2.3.2 Воспалительный иммунный ответ	39
1.2.3.3 Восстановление целостности нейроваскулярной единицы	41
1.3 PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-1 γ coactivator-1 α)	45
1.4 Экспериментальные модели ишемического инсульта	49
1.4.1 Общая характеристика моделей ишемии	49
1.4.2 Фотоиндуцированный тромбоз сосудов головного мозга крысы	55

в структурах мозга крыс после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры	110
3.1.2 Влияние производных эритропоэтина на нарушение поведение и объем очага при двустороннем ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга	115
3.1.3 Влияние производных эритропоэтина на содержание в сыворотке крови белка S100b у крыс с ишемическим повреждением головного мозга	118
3.1.4 Влияние комбинированной терапии на морфофункциональные нарушения при фотохимическом ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга	121
3.1.5 Формирование пространственной памяти у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга: эффекты синтетического аналога АКТГ ₄₋₇	124
3.1.5 Влияние синтетического аналога АКТГ ₄₋₇ на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий	130
3.1.6 Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на индукцию церебрального митохондриогенеза	132
3.2. Влияние острой ишемии на уровень транскрипционного коактиватора PGC-1 α и экспрессию белков-маркеров активности PGC-1 α в коре головного мозга	138
3.3 PGC-1 α -модулирующая активность препаратов с нейропротекторным действием	145
3.3.1. Влияние нейропротективной терапии на размеры очага инсульта, размеры и клеточный состав пенумбры	145
3.3.2 Влияние нейропротективной терапии на экспрессию и активность PGC-1 α в зоне перинфарктной зоне	153
3.3.3. Влияние нейропротекторной терапии на экспрессию и ядерную транслокацию PGC-1 α в нейронах перинфарктной зоны	158
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	164
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	180
ВЫВОДЫ	182
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	184
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	189

ВВЕДЕНИЕ

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, патологический 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, что позволит предотвращать, блокировать или замедлять повреждающие биохимические процессы, имеющие место при ишемическом инсульте.

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 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α), открытый в 1998 году (Scarpulla R. C. *et al*, 2012; Ventura-Clapier R. *et al*, 2008). В настоящее время показано, что PGC-1 α осуществляет активацию свыше двух десятков транскрипционных факторов, причем вне ассоциации с PGC-1 α эти факторы практически утрачивают свою активность. Наиболее значимыми транскрипционными факторами, определяющими механизмы выживания

нейронов, являются: ядерный респираторный фактор NRF1/2 (nuclear respiratory factor), контролирующий экспрессию более 70% ферментов энергопродуцирующей системы митохондрий; γ -рецептор, активируемый пролифератором пероксисом PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor), который контролирует экспрессию митохондриальных ферментов окисления жирных кислот и противовоспалительных факторов; α -рецептор, связанный с эстрогеном ER α (estrogen-related receptor), активирующий экспрессию антиоксидантных ферментов, факторов слияния митохондрий и проангиогенных факторов; глюкокортикоидные рецепторы, запускающие экспрессию иммуносупрессорного цитокина - трансформирующего фактора роста TGF β 1 (transforming growth factor β 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 α 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 α отмечается при нейродегенеративных заболеваниях. При этом, исследования динамики PGC-1 α 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 α в постишемическом периоде, а также зависимости тяжести молекулярно-клеточных и функциональных нарушений от активности PGC-1 α после ишемии. В связи с этим, представляет интерес изучение роли PGC-1 α 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 α в перифокальной зоне префронтальной коры в раннем постишемическом периоде (с 1-го по 21 сутки).
3. Определить уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 α
4. Оценить внутриклеточную локализацию PGC-1 α 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 α -модулирующую активность аналогов нейропептидов и непептидных соединений, реализующих рецептор-опосредованные защитные эффекты на экспрессию, внутриклеточную локализацию и активность PGC-1 α в перинфарктной зоне коры головного мозга.

Научная новизна исследования

В развитии ишемического инсульта впервые выявлен единый триггерный механизм дизрегуляции внутриклеточных нейропротективных систем – устойчивое снижение уровня и деактивация транскрипционного коактиватора PGC-1 α – 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 α в остром постишемическом периоде. Впервые показано, что нейропротективные эффекты 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината и пептида-миметика АКТГ₄₋₇ (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) – препаратов, относящихся к разным фармакологическим группам, реализуются через механизм индукции и активации транскрипционного коактиватора PGC-1 α , проявляющего плеiotропное потенцирующее влияние на выживаемость и функциональную активность нейронов.

Научно-практическая значимость работы

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

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

Методология и методы исследования

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», 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

Для исследования нейропротективных эффектов препаратов различных фармакологических групп экспериментальные животные делились на группы: 1 – крысы, с двусторонним фотохимическим повреждением префронтальной коры головного мозга без терапии (NaCl 0,9% 0,5 мл внутривенно, продолжительность соответствовала схемам опытных животных с введением фармакологических препаратов), 2 - крысы с двусторонним фототромбозом префронтальной коры головного мозга, которые начиная со дня операции (через 1-2 часа после фототромбоза) и по схеме получали препараты (антитела к ГЛУ, производные ЕРО, ГК-2, 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат или синтетический аналог АКТГ₄₋₇); 3 – ложнооперированные – с проведением всех манипуляций как в 1 группе, без введения бенгальского розового; 4 – интактный контроль. Условный рефлекс пассивного избегания вырабатывали у животных до фотохимического повреждения, в эксперимент брали животных с латентным периодом УРПИ – 300 сек. Нарушение поведения вследствие

экспериментального инсульта и в результате терапии оценивали по ЛП УРПИ через 4-8 дней после фототромбоза.

Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс (префронтальной коре, гиппокампе) определяли на 1-е и 8-е сутки после фототромбоза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионпарная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД).

Белок S100b - маркер повреждения мозговой ткани определяли в образцах сыворотки крови крыс с использованием тест-системы “Rat soluble protein-100B (S-100B) ELISA Kit”, согласно инструкции производителя. Исследование уровня белка S100b у ишемизированных животных, получавших терапию и без нее определяли на 4-е сутки после ишемического повреждения.

Для морфометрического измерения объема ишемического очага использовали мозг экспериментальных животных, зафиксированный на 4-7-ые сутки после ишемического повреждения.

Объем поражения мозга также исследовали при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) на 4-е сутки. Сканирование головного мозга производили 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).

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

Изучение потенциальной PGC-1 α -модулирующей активности двух препаратов, имеющих нейропротекторные эффекты было выполнено на 96 животных. Первый этап исследования заключался в оценке динамики (3-й, 7-й, 21-й дни постишемического периода) площади инфаркта и протяженности периинфарктной зоны префронтальной коры (ПФК) головного мозга крыс с клеточными изменениями после фотоиндуцированного тромбоза сосудов и применения 7-дневного курса препаратов - 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (ЭМГП, 100 мг/кг, в/б, ежедневно) и пептида-миметика АКТГ₄₋₇ (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) (25 мкг/кг, и/н, ежедневно). В периинфарктной зоне производили подсчет нормальных и гиперхромных нейронов, макрофагов и нейтрофилов; оценивалось состояние микроциркуляторного русла (наличие кровоизлияний, эритроцитарных стазов, диапедеза эритроцитов).

Второй этап работы состоял в оценке методом иммуноблоттинга (3-й, 7-й, 21-й дни постишемического периода) уровня экспрессии транскрипционного коактиватора PGC-1 α и PGC-1 α -зависимых белков-маркеров митохондрио-, ангио-, синаптогенеза в ткани пенумбры ПФК у крыс, подвергнутых фотохимическому тромбозу коры без лечения (0,5 мл NaCl 0,9% внутривенно 7 дней) и получавших 7-дневную терапию сукцинатсодержащего ЭМГП сукцината и синтетического аналога АКТГ₄₋₇.

Третий этап исследования заключался в оценке методами иммуногистохимии и флуоресцентной микроскопии (3-й, 7-й, 21-й дни постишемического периода) уровня ядерного PGC-1 α (функционально активная форма PGC-1 α) в нейронах ткани пенумбры ПФК у ишемизированных нелеченных и получавших терапию ЭМГП сукцинат или АКТГ₄₋₇ крыс.

Статистический анализ данных проводили по алгоритмам программы Statistica 7.0 с использованием параметрических и непараметрических методов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ишемический инсульт приводит к снижению уровня транскрипционного коактиватора PGC-1 α - ключевого регулятора процессов биогенеза митохондрий, ангио- и синаптогенеза в коре головного мозга в раннем постишемическом периоде.
2. Уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 α повышается в первые сутки после ишемии и снижается в более поздние сроки (3-21-е сутки), что указывает на кратковременную активацию PGC-1 α 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 α , контролирующего механизмы противовоспалительной поляризации иммунцитов в области очага.
4. Стимуляция экспрессии и активности PGC-1 α 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 α 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 поиск и анализ литературы по проблеме диссертации, сформулирована цель и задачи исследования, выполнен выбор методов исследования и схемы экспериментов. Все ключевые эксперименты выполнены автором лично. Комплекс исследований на животных был проведен лично автором и включает: подготовку животных к экспериментам, моделирование фокальной ишемии головного мозга, оценку неврологического дефицита с использованием поведенческих методик. Комплекс биохимических исследований (вестерн-блот анализ, иммуногистохимический анализ) осуществлялся автором совместно с д.б.н. Кировой Ю.И. Анализ моноаминов и их метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии выполнен автором совместно с к.м.н. В.С. Кудриным на базе лаборатории нейрохимической фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова». Часть вошедших в диссертационную работу данных получена в соавторстве с другими исследователями. 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 29 рисунками. В список литературы включено 341 работа: 53 отечественных и 288 зарубежных источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ишемический инсульт. Определение понятия, этиология, эпидемиология

Ишемический инсульт – острое нарушение мозгового кровообращения с повреждением ткани мозга, нарушением его функций вследствие полного прекращения или снижения поступления крови к тому или иному отделу мозга, который сопровождается размягчением участка мозговой ткани – инфарктом мозга (Ворлоу Ч.П., 1998; Реутов В.П., 2016). Клинически инсульт представлен очаговыми и общемозговыми нарушениями, развивающийся внезапно вследствие прекращения кровоснабжения определенного его отдела в результате окклюзии артерий и гибелью ткани головного мозга (Гусев Е.И., 2003; Хеннерици М.Дж., 2008). К наиболее частым причинам развития инсульта относятся: атеротромботические окклюзии крупных артерий; эмболии сосудов головного мозга (эмболический инфаркт); нетромботическая окклюзия мелких, глубоких мозговых артерий (лакунарный инфаркт) и проксимальный стеноз артерии с гипотонией, который уменьшает мозговое кровообращение в артериальных зонах (гемодинамический инсульт). К более редким причинам инсульта могут относиться - васкулиты, вследствие острых инфекционных заболеваний; расслоение стенки церебральных артерий или аорты; заболевания, сопровождаемые гиперкоагуляцией (антифосфолипидный синдром, гипергомоцистеинемия) или повышением вязкости крови (полицитемия, тромбоцитоз, гемоглобинопатии, патология плазматических клеток) (Morgan J.A., 2014; Kernan W.N., 2014).

Данные международного проекта по изучению глобального бремени заболеваний (Global Burden Diseases — GBD) показывают, что ежегодно регистрируется 12,2 млн случаев инсульта, из которых 6,55 млн заканчиваются смертью (GBD Stroke Collaborators, 2021). По данным Всемирной организации по борьбе с инсультом (WSO), опубликованным в

2022 году, инсульт продолжает занимать второе место в мире среди причин смертности населения (11,9%) (Feigin V. et al, 2022).

В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствует статистика заболеваемости инсультом и цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ), включая инсульт, рассматриваются как одна нозологическая форма. По данным Министерства здравоохранения, показатель заболеваемости цереброваскулярными заболеваниями в РФ в 2016 году составил 950,9 на 100 тыс. населения, из которых примерно у четверти зарегистрирован ишемический инсульт. ЦВЗ и в РФ занимают второе место в структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Территориально-популяционный регистр по 7 регионам РФ показал, что доля ишемического инсульта среди всех инсультов в 2016 году составила до 85,4%, а суммарной показатель 28-дневной летальности - 12,4% (Шамалов Н.А., 2019). Стоит отметить, что в 2010 году эта цифра составляла 21,5%, то есть в течение первого месяца после инсульта каждый пятый пациент уходил из жизни. Другие авторы также отмечают, что в острый период инсульта летальность достигает 35% и к концу первого года с момента развития заболевания погибают около 50% больных (Пирадов М.А. и др., 2019).

Социально-экономический ущерб от инсульта как в РФ, так и в мировом масштабе весьма высок. В последние десятилетия для выражения бремени инсульта широко используется показатель преждевременно утраченных лет полноценной жизни (Disability-Adjusted Life Years - DALY), который в мировом масштабе составляет 113 млн лет. По оценкам проекта GBD, в 2013 г. инсульт в Российской Федерации обусловил потерю 5,3 млн лет полноценной жизни вследствие нетрудоспособности и преждевременной смертности (Пирадов М.А. и др., 2019). Среди причин первичной инвалидизации, инсульт занимает первое место, достигая по данным разных авторов 40-60%, причем большая пациентов после инсульта становится зависима от окружающих или нуждается в постороннем уходе (Jauch E.C. et al., 2013). К концу 1-го года после инсульта в России умирает каждый 2-й

больной, а через 7 лет – почти 80% заболевших (Клочихина О.А., Стаховская Л.В., 2014). В РФ проживают свыше 1 млн человек, перенесших инсульт, при этом треть из них составляют лица трудоспособного возраста, к трудовой же деятельности возвращается только каждый четвертый пациент (Пирадов М.А., 2019).

В этих условиях выявление механизмов нарушения регуляции, поиск эффективных лекарственных препаратов с нейропротективным действием и разработка новых стратегий терапии инсульта остаются одними из важнейших задач современной медицины.

1.2 Современные представления о патогенезе ишемического инсульта

1.2.1 Основы дизрегуляции внутриклеточных систем при ишемии

Ишемия головного мозга – одна из наиболее распространенных форм патологии центральной нервной системы (ЦНС) в клинике нервных болезней и нейрохирургии. Развитие инсульта является грозным осложнением церебральной ишемии, сопровождающимся стойким очаговым морфологическим дефектом мозговых структур, что в свою очередь приводит к дизрегуляторной патологии различных функций ЦНС (Крыжановский Г.Н., 2002). В своих фундаментальных трудах Г.Н. Крыжановский отмечал, что каждый патологический процесс вызывает в той или иной форме и мере нарушения регуляции деятельности органа и ткани, в которых он возник. Эта концепция хорошо согласуется с представлениями Р. Вирхова о том, что любая «болезнь начинается с недостаточности регуляторных механизмов» (Реутов В.П., 2021). Существует большое количество различных форм патологии, в которых такая дизрегуляция является не конечным результатом процесса, а его причиной. Такие формы патологии могут возникать на всех структурно-функциональных уровнях организма и объединяются они под термином «дизрегуляторная патология». При дизрегуляторной патологии нарушения регуляции деятельности органов и их функций являются причиной и эндогенным

патогенетическим механизмом либо дальнейшего развития данного процесса, либо возникновения новых патологических процессов (Крыжановский Г.Н., 2009). Существуют два основных типа дизрегуляции — количественная и качественная. Количественная дизрегуляция возникает при недостаточности либо избыточности действия биологически активных веществ (медиаторов, трофогенов, цитокинов, пептидов и пр.), неконтролируемой сенситизации структур (например, рецепторов и каналов). Она выражается в изменении меры реакции и ее результата, однако качество реакции и ее природа остаются неизменными. Качественная дизрегуляция — это извращение сущности реакции и ее результата: этот результат может быть диаметрально противоположным результату, достигаемому этими же образованиями в норме. К качественно измененной регуляции относятся изменения деятельности ионных обменников, депонирования ионов, изменение транспорта биологически активных веществ и др. Например, вместо депонирования глутамата глиальными клетками происходит его выброс в межнейронную среду, что приводит к эксайтоксичности и гибели нейронов; извращение деятельности ферментов в виде расщепления несвойственных им субстратов, например - несвойственное моноаминоксидазе дезаминирование ГАМК, вследствие чего исчезает тормозной эффект ГАМК. Наглядной демонстрацией качественной дизрегуляции является инверсия деятельности защитных белков шаперонов в патогенезе нейродегенеративных процессов: вместо предотвращения, как в норме, возникновения нерастворимых агрегатов дефектных белков, вызывающих нейрогенерацию, — участие в образовании этих агрегатов.

На клеточном уровне качественной дизрегуляционной патологией в нервной системе является возникновение патологических интеграций измененных нейронов. Эти интеграции возникают из измененных и обратимо поврежденных нейронов с нарушенной ауторегуляцией и резистентностью. Все интеграции возникают при участии патопластичности. Еще одним примером качественной дизрегуляции является митотическая катастрофа

нейрона. Тот факт, что нейрон входит в митоз, свидетельствует, что у него появилась программа митотического деления. Этот митоз аберрантный, потому что возникающая программа митоза интерферирует с антагонистической программой дифференцировки. Конфликт указанных программ обуславливает не только аберрантный митоз, но и глубокую качественную дисрегуляторную патологию нейрона, что и является причиной его гибели. Предполагается, что митотическая катастрофа нейрона может быть также стадией нейродегенеративных заболеваний.

Ишемия и, как следствие – оксидативный стресс является фактором дисрегуляторного патологического растормаживания нейрона, ведущего к аберрантному митозу. Каковы бы ни были триггерные процессы митотической катастрофы нейрона, она является глубокой, качественной дисрегуляцией в виде эндогенно развивающейся патологии нейрона, связанного с дисрегуляцией его генетического аппарата. Стоит отметить, что и количественная, и качественная дисрегуляция имеют место в соматической патологии и при других видах расстройств. Они являются общей патобиологической категорией (Крыжановский Г.Н., 2009).

Особого внимания заслуживает механизм дисрегуляции кальциевого гомеостаза нейронов головного мозга при гиперстимуляции глутаматных рецепторов, поскольку он является одним из ключевых звеньев в патогенезе ишемического инсульта. По существующим представлениям, гиперстимуляция глутаматных рецепторов, обусловленная избыточным выделением и накоплением в синаптических щелях возбуждающего нейромедиатора глутамата (ГЛУ), играет ключевую роль в механизме отсроченной гибели нейронов мозга после его кратковременного лишения нормального кровоснабжения. В этих условиях ГЛУ вызывает изменения цитоплазматической концентрации Ca^{2+} , поскольку известно, что именно чрезмерное повышение Ca^{2+} инициирует каскад внутриклеточных процессов, завершающихся гибелью нейронов. Интерес представляет сопровождаемое повышением Ca^{2+} , снижение трансмембранного потенциала митохондрий

(V_{mit}), который, как известно, контролирует две их основные функции – синтез АТФ и электрофоретический захват цитоплазматического Ca^{2+} , крайне важные аспекты реализации энергетической функции митохондрий. Ранее показано, что величина митохондриальной деполяризации (МД) варьирует и находится в сильной зависимости от возраста культивируемых нейронов (Vergun O. *et al.*, 1999). Так, у молодых нейронов ГЛУ (100 мкМ), как правило, вызывает слабую и обратимую МД. В отличие от молодых, зрелые нейроны в большинстве случаев отвечают на воздействие ГЛУ сильной МД, имеющей двухфазный характер. Наиболее вероятной причиной открывания митохондриальной поры при воздействии ГЛУ является Ca^{2+} -перегрузка митохондрий. Также в исследованиях была обнаружена высокая корреляция между ГЛУ-инициированной митохондриальной деполяризацией и нарушением процесса восстановления после окончания воздействия ГЛУ (Khodorov B., 1996; Vergun O. *et al.*, 1999). Так, в большинстве зрелых нейронов, отвечающих на токсическое воздействие ГЛУ сильной моно- или двухфазной митохондриальной деполяризацией, удаление ГЛУ не приводило к восстановлению Ca^{2+} , ее концентрация удерживалась на уровне высокого плато. Напротив, нервные клетки, у которых ГЛУ вызвал слабую монофазную МД, как правило, сохраняли способность восстанавливать как митохондриальный потенциал, так и Ca^{2+} . Дальнейшие исследования привели к выводу, что в основе этой корреляции лежит патологическая положительная обратная связь, возникающая во время воздействия глутамата между изменениями Ca^{2+} и митохондриального потенциала. Повышение Ca^{2+} , обусловленное избыточным входом Ca^{2+} через мембрану по ГЛУ-каналам, инициирует сильный входящий поток Ca^{2+} в митохондрии, который приводит к деполяризации мембраны. Возникающая при этом МД резко ослабляет дальнейший электрофоретический вход Ca^{2+} . Поскольку поступление Ca^{2+} в цитоплазму по ГЛУ-активированным каналам в это время еще продолжается, прекращение или ослабление митохондриального Ca^{2+} - захвата ведет к новому повышению Ca^{2+} и как следствие к дальнейшему усилению МД до

достижения уровня высокого плато. Этот порочный круг завершается установлением Ca^{2+} и сопровождающей его МД на квазистационарных уровнях, которые утрачивают обратимость и поэтому длительное время удерживаются после удаления ГЛУ из раствора.

Состояние нейрона в конце продолжительного воздействия ГЛУ и после его окончания заслуживает специального внимания. Действительно, тот факт, что удаление Ca^{2+} из наружного раствора в этом периоде у большинства клеток не сказывается на уровне Ca^{2+} - плато, достигнутом во время действия ГЛУ, свидетельствует о глубоком нарушении Ca^{2+} сигнализации: как вход, так и выход Ca^{2+} через плазматическую мембрану, равно как и Ca^{2+} - захват митохондриями, сильно заторможены. В результате Ca^{2+} , проникший в избыточном количестве в нейрон в начале воздействия ГЛУ, в конце оказывается «запертым» в цитоплазме, как в ловушке. Прекращение входа Ca^{2+} по ГЛУ-каналам в условиях нарушения систем его выведения некоторые авторы рассматривают как меру «последней защиты», поскольку она предоставляет клетке некоторые шансы на выживание в постглутаматный период (Vergun O., 1999; Крыжановский Г.Н., 2002).

Под влиянием высоких концентраций Ca^{2+} активируются некоторые ферменты, вызывающие деградацию макромолекул. С этого момента начинается фаза экспрессии, в течение которой происходят необратимые изменения, приводящие к гибели нейронов. В этот период усиливается процесс свободнорадикального окисления липидов, образования высокореактивных свободных радикалов, которые вызывают окисление биомacroмолекул, нарушают метаболизм нейронов, активируют процесс деструкции нейрональных мембран, поврежденных ишемией. Оксид азота (NO) как свободный радикал становится существенным фактором патобиохимического каскада, приводящего к повреждению и гибели нейронов при ишемии мозга на основе механизмов некроза и апоптоза (Романова Г. А., 2002).

1.2.2 Клеточные реакции, связанные с острой фокальной ишемией мозга

Все специфические для нервной ткани процессы, характеризующие деятельность головного мозга в целом, такие как - проведение нервного импульса, синаптогенез, хранение и переработка поступающей информации, поддержание пространственно-функциональной архитектоники мозга, образование функциональных сетей нейронов и др. очень тесно зависят от уровня энергетического обмена, определяемого прежде всего поступлением с кровотоком O_2 и глюкозы в нервную ткань. Головной мозг потребляет порядка 20-25% поступающего в организм O_2 и до 70% свободной глюкозы, занимая ведущее место среди всех органов по интенсивности дыхания. В результате окислительно-восстановительных митохондриальных процессов в ткани мозга образуется 95% аденозинтрифосфата (АТФ). Как следствие, недостаточность поступления O_2 в клетки мозга вызывает изменение возбудимости нейрональных мембран и вторично - нарушение информационной передачи (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001).

Известно, что острая ишемия мозга запускает ряд патобиохимических реакций, вызывая стойкие нейрональные нарушения, астроцитоз, микроглиальную активацию, а также сочетанные с ними изменения нейтрофилов, макрофагов, эндотелиальных клеток. Размер участка ишемического повреждения с необратимыми повреждениями (ядро ишемии) и запускаемый каскад клеточных реакций, обуславливающий дальнейшее состояние зоны пенумбры, зависят от тяжести и продолжительности ишемии. При кратковременной фокальной ишемии поражаются только отдельные наиболее чувствительные нейроны (Brierley J.B., 1984). По мере усиления и удлинения периода ишемического воздействия избирательность клеточной гибели теряется, и тканевое повреждение прогрессирует по общим принципам (Kogure K., 1996), детерминируя формирование очага повреждения по механизмам некроза и апоптоза.

В пенумбре быстрее и интенсивнее нейронов, поражаются клетки глии, выполняющие важную трофическую функцию (Pulsinelli W.A. 1995). При этом процессы повреждения всех клеточных пулов мозга взаимосвязаны и взаимозависимы. Глиальные клетки количественно значительно преобладают над нейронами, занимая весь объем между сосудами и нейронами. Иногда сложно отделить нейрональную фракцию от нейроглиальной, поскольку центральные нейроны тесно окружены клетками нейроглии (Флеров М.А., 1996).

Основой взаимодействия глии и нейронов в норме и при патологии и является их тесная морфологическая взаимосвязь (Wood P.L., 1994). Развитие концепции существования в центральной нервной системе (ЦНС) динамических нейронально-глиальных сигнальных процессов, которые ранее представлялись лишь как пассивная передача информации между этими клеточными звеньями является результатом почти векового исследования связи нейронов и глии (Kettenmann H., Ransom B.R., 2004). Стоит отметить, что еще в прошлом веке, еще до определения концепции нейроваскулярной единицы, исследователи обращали внимание на то, что кроме трофической функции, глия может принимать активное участие в специфическом функционировании нервной ткани, внося значительный вклад в электрогенез мозга (Magistretti P.J., Pellerin L., 1996). Благодаря избирательно повышенной проницаемости для ионов K^+ , астроглия регулирует активацию ферментов, необходимых для поддержания метаболизма нейронов, а также для дезактивации медиаторов и других агентов, выделяющихся в процессе нейрональной активности (Barres B.A., 1991).

Чрезвычайно важное значение при ишемии имеет активный захват астроцитами из синаптической щели и метаболизация глутамата (Barres B.A., 1991), избыточный выброс которого, как отмечалось ранее, приводит к необратимым повреждениям нейронов. Глия также участвует в синтезе цитокинов и других сигнальных молекул (циклический гуанозинмонофосфат — cGMP, оксид азота — NO), передаваемых нейронам, а также в синтезе

глиальных ростовых факторов (GDNF), участвующих в трофике и репарации нейронов. Кроме этого, установлена способность астроцитов отвечать на увеличение концентрации нейротрансмиттеров (Magistretti P., Pellerin L., 1997) и изменения электрической активности нейронов изменением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , что приводит к перераспределению ионов Ca^{2+} между астроцитами, вызывая колебания их концентрации, что в свою очередь может модулировать состояние нейронов (Флеров М.А, 1996). Интересным представляется тот факт, что в условиях острой фокальной ишемии мозга механизмы отсроченной смерти нейронов непосредственно связаны с агрессивным воздействием возбужденной ишемией нейроглии на еще жизнеспособные клетки перинфарктной области (Garcia J.H., 1996; Rinner W.A., 1995). Несмотря на теснейшие взаимоотношения нейронов и глии, метаболические процессы в них строго разграничены, что выражается в отделении биосинтетических процессов от тех метаболических путей, которые строго контролируются энергетическими нуждами (Ашмарин И.П. 1996; Флеров М. А, 1996). В этих условиях построение внутренних механизмов связи, использующих сходные сигналы (нейротрансмиттеры, цитокины, факторы роста, гормоны) и действующих на сходные распознающие мишени (рецепторы), обеспечивает взаимодействие нервной, иммунной и эндокринной систем для осуществления единого организованного ответа на патологические воздействия, в том числе на острую церебральную ишемию (McGeer E.G., 1993; Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001).

На модели окклюзии средней мозговой артерии у крыс, экспериментально воспроизводящей картину инсульта, ранее была показана последовательность реакций разных клеточных конгломераций мозга на острую фокальную ишемию. Хотя и существуют различия в развитии процессов повреждения в мозге грызунов и человека (Tagaya M., 1997; Li Y., Chopp M., 1995), общие черты вызванных ишемией нарушений, позволяют в определенной мере экстраполировать данные экспериментов на понимание

клеточных механизмов при инсульте у человека, что крайне важно для их дальнейшего более глубокого изучения при инсульте, а также для исследования соединений, обладающих нейропротективной активностью на разных этапах.

Критически важным для чрезвычайно чувствительной к энергетическому дефициту ткани мозга, являются первые изменения в нейронах, которые наблюдаются уже через 30 мин после окклюзии сосуда и проявляются признаками сморщивания. Через час и, в течение примерно первых 6 часов, в нейронах начинают выявлять скопления гетерохроматина, расширение эндоплазматического ретикулума, вакуолизацию, набухание внутреннего митохондриального матрикса (Garcia J.H., 1995; Garcia J.H., 1993). Через 10-12 часов в центральной зоне ишемии уже обнаруживаются признаки необратимого клеточного повреждения в виде разрушения цитоплазматических и ядерных мембран, отложения богатых кальцием солей во внутренней митохондриальной мембране (Garcia J.H., 1995; Garcia J.H., 1993) в зоне пенумбры обратимые изменения сохраняются более длительно. Первые погибшие нейроны клетки-«тени» находят в ткани мозга на 2-3-й сутки после инсульта.

Наряду с перечисленными признаками некротической смерти нейронов области ишемии, вдоль внутренней границы зоны ишемического ядра, наблюдаются клетки, погибающие по механизму программированной смерти — апоптоза (Charriaut-Marlangue C., 1995, 1996; Li Y., Chopp M., 1995; Linnik M.D., 2002; Sadoul R., 1996). Первые из них появляются уже через 2 ч после инсульта, максимальное количество апоптозных клеток выявляется через 24—48 ч, а затем отмечается тенденция к его снижению (Chopp M., 1996). Однако апоптозные нейроны определяются в зоне «ишемической полутени» на протяжении 4 недель (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001).

Изменения астроцитов в виде набухания, фрагментации отростков и дезинтеграции наблюдаются с первых минут ишемии, предшествуют нейрональным изменениям, и сопровождаются снижением экспрессии

астроцитарного маркера — кислого глиального фибриллярного белка (GFAP). Однако через 4—6 ч после развития ишемии отмечается активация астроцитов, окружающих ишемическую зону, которые начинают усиленно синтезировать GFAP (Garcia J.H., 1993). В более поздние сроки (через 24 ч) вокруг области инфаркта образуется сеть C/⁺P-позитивных астроцитов. Астроцитарная реакция становится все более агрессивной и ведет к формированию глиального рубца в конце 1-й — начале 2-й недели после развития инсульта (Clark R.K., 1993).

Уже через 6—8 ч после развития инсульта появляются реактивные изменения нейтрофилов в микроциркуляторном русле, которые вызваны активацией микроглии и резким повышением синтеза провоспалительных факторов, молекул клеточной адгезии. Характерными признаками являются адгезия нейтрофилов к эндотелию мелких сосудов, проникновение их через гематоэнцефалический барьер и инфильтрация ими ишемизированной ткани мозга (Clark R.K., 1993). Временная динамика реакции нейтрофилов варьирует в зависимости от особенностей ишемического процесса. После постоянной экспериментальной окклюзии средней мозговой артерии максимум нейтрофильной инфильтрации приходится на 48—96 ч с момента развития инсульта (Clark R.K., 1993; Chopp M., 1994), затем количество нейтрофилов в ткани мозга начинает снижаться. Макрофаги из кровяного русла начинают проникать в ишемизированную нервную ткань в конце 1-х суток после экспериментального инсульта, однако процесс инфильтрации макрофагами зоны ишемии становится максимально выраженным только на 5—7-е сутки.

1.2.2.1 Глутаматная эксайтотоксичность

Значительная часть вызванного ишемией повреждения нейронов опосредована чрезмерным накоплением возбуждающих аминокислот, что приводит к токсическому увеличению внутриклеточного кальция (Mehta S.L. *et al.*, 2007). Хотя этот механизм является исходно защитным в ответ на

ишемии путем активации реакции на сильный клеточный стресс, как это ни парадоксально, увеличение внутриклеточного кальция активирует множество сигнальных путей, что в конечном итоге приводит к гибели нейрона. Вскоре после уменьшения или прекращения мозгового кровотока энергозависимые клеточные насосы выходят из строя из-за снижения выработки глюкозозависимого АТФ, что приводит к поступлению в клетку многочисленных ионных соединений. Это приводит к набуханию клеток за счет осмоса и клеточной деполяризации. Ионы кальция (Ca^{2+}) проникают в клетку через вольт-зависимые и лиганд-зависимые ионные каналы, что приводит к активации ряда протеаз, киназ, липаз и эндонуклеаз, запуская внутренний апоптотический путь и, таким образом, приводит к гибели клеток (Lipton P., 1999; Mehta S.L., 2007).

Глутамат, который является основным возбуждающим нейромедиатором в головном мозге, накапливается во внеклеточном пространстве после ишемии и активирует его рецепторы (Martin H.G., Wang Y.T., 2010). Глутамат-активация рецептора вызывает изменения концентрации внутриклеточных ионов, в первую очередь ионов Ca^{2+} и натрия (Na^+) (Woodruff T.M. *et al.*, 2011). Вызванный ишемией энергетический дефицит приводит к деполяризации нейронов. Активация специфических глутаматных рецепторов резко увеличивает концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} , Na^+ и K^+ , которые высвобождаются во внеклеточное пространство. Возникает отек в результате перемещения H_2O во внутриклеточное пространство. Повышенный уровень внутриклеточного мессенджера Ca^{2+} активирует протеазы, липазы и эндонуклеазы. Образуются свободные радикалы, которые повреждают мембраны, митохондрии и ДНК, что в свою очередь вызывает гибель клеток и вызывает образование медиаторов воспаления, индукцию протеинкиназ, активацию факторов транскрипции (AP-1) в глиальных клетках, эндотелиальных клетках и инфильтрирующих лейкоцитах. Это приводит к секреции

провоспалительных цитокинов и хемокинов и к инвазии лейкоцитов посредством усиления регуляции молекул эндотелиальной адгезии.

Повышение внутриклеточного Na^+ может быть вредным для выживания нейронов в ранние сроки после ишемии (Won S.J. et al, 2002). Однако, большинство исследователей сходятся на том, что токсичность глутамата в первую очередь зависит от притока Ca^{2+} в клетку (Arundine M., Tymianski M., 2004; Mattson M.P., 1997).

1.2.2.2 Окислительный стресс

Многочисленные экспериментальные и клинические наблюдения показали повышенное образование свободных радикалов как при травме головного мозга, так и при инсульте. Свободные радикалы - высокореактивные молекулы с одним или несколькими неспаренными электронами, которые могут вступать в реакцию с ДНК, белками и липидами, вызывая различную степень повреждения и дисфункцию (Suh S.W. et al., 2008; Choi K. et al., 2009). Известно, что свободные радикалы, включая супероксидный анионный радикал, гидроксильный радикал и оксид азота (NO) участвуют в повреждении головного мозга, вызванном инсультом (Suh S.W. et al., 2008; Allen C.L., Bayraktutan U., 2009).

Важно отметить, что ранее в Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР/РАН (ИВНД и НФ АН СССР/РАН) впервые была сформулирована и обоснована концепция цикла оксида азота, а затем концепция цикла супероксидного анион-радикала. Было установлено, что цикл оксида азота может активироваться при гипоксии/ишемии (Реутов В.П., 1995,1998,1999,2000,2002). Согласно развиваемым представлениям, циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала являются следствием наличия универсального принципа цикличности (Реутов В.П., 1998, 2002). Цикл NO может активироваться как вместе с NO-синтазной, так и нитритредуктазной компонентами. Активация NO-синтазной компоненты связана а) с увеличением поступления внутрь нейронов ионов Ca^{2+} на первой стадии

глутаматного воздействия, при гипоксии/ишемии; и б) снижением активности Ca^{2+} -АТФ-аз на последующих ее стадиях, вследствие уменьшения содержания АТФ в клетках, других высокоэнергетических субстратов и митохондриального мембранного потенциала (Реутов В.П., Сорокина Е.Г., 2021). В результате этого явления происходят нарушения ионного гомеостаза – в первую очередь ионов Ca^{2+} – и ионов Na^+/K^+ . При этом содержание одних ионов (например, ионов Ca^{2+}) выходит на плато (явление отсроченной кальциевой дисрегуляции – ОКД), а содержание других ионов – Na^+ – вместе с молекулами воды (H_2O) продолжает увеличиваться. Эти явления сопровождаются энергетическим дефицитом практически во всех клетках (в том числе в нейронах и глиальных клетках) на фоне развития набухания и отеков этих нервных (нейронов и глиальных клеток) или других клеток и тканей. Явление имеет неспецифический характер и характерно не только при воздействии токсическими концентрациями ГЛУ и NO-генерирующих соединений; при гипоксии/ишемии.

Дефицит энергии в мозге при гипоксии/ишемии и увеличение концентрации NO могут ингибировать электронно-транспортные цепочки в митохондриях, и, тем самым, снижать содержание АТФ и митохондриального мембранного потенциала, приводя к нарушению ионного гомеостаза (Реутов В.П., Сорокина Е.Г., 2021). Вместе с этими нарушениями вокруг ионов Na^+ в нейронах могут накапливаться молекулы H_2O , а вместе с ними могут развиваться явления набухания и отечности. Такие же изменения, какие происходят в мозге *in vivo* происходят при токсическом воздействии глутамата, NO-генерирующих соединений и при ишемии.

Основной источник свободных радикалов, производных кислорода (часто называемых «активными формами кислорода» (АФК) - поврежденные во время ишемического инсульта митохондрии, которые продуцируют супероксидные анионные радикалы в процессе переноса электронов (Allen S.L., Bayraktutan U., 2009). Другим потенциально важным источником супероксида в постишемических нейронах является метаболизм

арахидоновой кислоты через циклооксигеназный и липооксигеназный пути (Hall E.D., 1995; Im J.Y. *et al.*, 2006). Свободные радикалы кислорода также могут генерироваться активированной микроглией и проникать в периферические лейкоциты через систему NADPH-оксидазы после реперфузии ишемизированной ткани (Stoll G., 1998). Это окисление вызывает дальнейшее повреждение тканей и, как полагают, является важным пусковым механизмом для апоптоза после ишемического инсульта. NO образуется из L-аргинина через одну из нескольких изоформ NO-синтазы (NOS). Нейронная форма (nNOS), для активации которого требуется кальций/кальмодулин, экспрессируется субпопуляциями нейронов по всему мозгу (Dawson V.L., Dawson T.M., 1998). Индуцируемый NOS (iNOS) экспрессируется воспалительными клетками, такими как микроглия и моноциты. Эти две изоформы, по большей части, повреждают мозг в условиях ишемии. Третья изоформа, обнаруженная в эндотелиальных клетках (eNOS), обладает сосудорасширяющим действием и, вероятно, играет полезную роль, улучшая местный кровоток (Kukreja R.C., Xi L., 2007).

Было показано, что активация рецептора NMDA стимулирует оксид азота, производство nNOS, что, возможно, играет определенную роль при эксайтотоксически опосредованном ишемическом повреждении (Bhardwaj A. *et al.*, 1997). NO свободно диффундирует через мембраны и может вступать в реакцию с супероксидом с образованием пероксинитрита (ONOO), другой высокоактивной формой кислорода (Love S., 1999).

Как свободные радикалы, производные кислорода, так и активные формы азота участвуют в активации нескольких путей, участвующих в гибели клеток после инсульта, таких как апоптоз и воспаление. Большое количество данных свидетельствует о том, что окислительный стресс и апоптоз - тесно взаимосвязанные явления в патофизиологии ишемического инсульта (Yamamoto E. *et al.*, 2008; Ridder D.A, Schwaninger M., 2009; Chong Z.Z. *et al.*, 2005).

1.2.2.3 Перекисное окисление липидов

Перекисное окисление липидов также играет ключевую роль в патогенезе инсульта. Уменьшение поступления кислорода приводит к накоплению лактата в результате анаэробного гликолиза и, следовательно, к ацидозу (Luo J., Sun D., 2007; Kiewert C. *et al.*, 2010; Sumbria R.K. *et al.*, 2011). Помимо образования различных видов кислородных радикалов, ацидоз нарушает и внутриклеточный синтез белка. Механизм, посредством которого перекисное окисление липидов мембран индуцирует апоптоз нейронов, включает образование альдегида, называемого 4-гидроксиноненалем (4-HNE), который ковалентно модифицирует мембранные транспортеры, такие как Na⁺/K⁺-АТФаза, транспортеры глюкозы и глутамата, тем самым нарушая их функцию (Mattson M.P., 2009). В то время как Ca²⁺ и свободные радикалы потенциально повреждают клетку посредством своего прямого действия, они также могут активировать нейропротекторные факторы транскрипции, включая ядерный фактор-В (NF-В), индуцируемый гипоксией фактор 1 и регуляторный фактор интерферона 1 (Dirnagl U. *et al.*, 1999). Некоторые из этих факторов транскрипции индуцируют экспрессию воспалительных цитокинов (например, IL-1, IL-6 и TNF-α) и хемокины (например, IL-8 и MCP 1), молекулы адгезии эндотелиальных клеток (например, селектины, ICAM-1 и VCAM-1) и другие провоспалительные гены (например, индуцируемый интерфероном белок 10) (Dirnagl U. *et al.*, 1999; Ishikawa M. *et al.*, 2004).

1.2.2.4 Воспаление

В ткани головного мозга существует несколько резидентных популяций клеток, которые способны выделять провоспалительные медиаторы после ишемического инсульта. К ним относятся эндотелиальные клетки, астроциты, микроглия и нейроны. Активация факторов транскрипции приводит к повышению уровня цитокинов и увеличению экспрессии эндотелиальных молекул клеточной адгезии (CAMs) в тканях головного мозга после инсульта (Tuttolomondo A. *et al.*, 2008; Okun E. *et al.*, 2009; Wang

Q. *et al.*, 2007). Основная роль в воспалении головного мозга после инсульта приписывается микроглии, особенно в области ишемической полутени (Gelderblom M. *et al.*, 2009). Активированная микроглия продуцирует многочисленные провоспалительные цитокины, а также токсичные метаболиты и ферменты (Okun E. *et al.*, 2009). В дополнение к клеткам микроглии, астроциты также играют важную роль в воспалении мозга, вызванном инсультом. Эти клетки могут продуцировать как провоспалительные цитокины, так и нейтропротекторные факторы, такие как эритропоэтин, TGFb1 и металлотионеин-2 (Mergenthaler P. *et al.*, 2004). Из-за смешанной природы микроглии и астроцитов (как деструктивных, так и защитных факторов) общая роль глии может отличаться в разные моменты времени после инсульта, при этом защитная или регенеративная активность происходит через несколько дней или недель после начала ишемии (Gelderblom M. *et al.*, 2009; Jin R. *et al.*, 2010). Эти факторы усложняют ситуацию как с точки зрения их патофизиологической роли в развитии инсульта, так и с точки зрения цели разработки новых терапевтических средств для лечения инсульта.

1.2.2.5 Дисфункция гематоэнцефалического барьера

Эндотелий головного мозга довольно своеобразен по сравнению с эндотелием других органов, о чем свидетельствует наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Однако он реагирует на повреждение, вызванное инсультом, повышенной проницаемостью и снижением барьерной функции, наряду с деградацией базальной пластинки стенки сосуда, как это происходит в других органах после ишемического повреждения (del Zoppo G.J., Hallenbeck J.M., 2000). Имеются доказательства того, что острый ишемический инсульт усиливает взаимодействие эндотелия головного мозга с внесосудистыми клетками ЦНС (астроцитами, микроглией, нейронами), а также с внутрисосудистыми клетками (пластинчатыми клетками, лейкоцитами), и что эти взаимодействия способствуют прогрессированию

повреждения (Ishikawa M. *et al.*, 2004). Конечным результатом всех этих реакций на инсульт является то, что сосудистая сеть головного мозга приобретает следующие свойства: 1) плохое капиллярное снабжение мозговой ткани, 2) проадгезивное (для циркулирующих клеток), 3) провоспалительное, 4) протромбогенное и 5) снижение барьерной функции эндотелия. Эти патологические изменения накапливаются, нанося серьезный ущерб ЦНС. Дисфункция ГЭБ также является значительной проблемой, стоящей на пути быстрого и эффективного лечения инсульта (Woodruff T.M. *et al.*, 2011).

1.2.2.6 Лейкоцитарная инфильтрация

На сегодняшний день имеются убедительные доказательства участия лейкоцитов в патогенезе инсульта. Утверждение о том, что лейкоциты опосредуют индуцированное реперфузией повреждение тканей и микрососудистую дисфункцию, подтверждается тремя основными доводами: 1) лейкоциты накапливаются в ишемизированной ткани до начала повреждения ткани, 2) животные, у которых наблюдается нейтропения, проявляют ослабленную реакцию на повреждение при ишемическом инсульте и 3) предотвращение адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток моноклональными антителами обеспечивают существенную защиту от повреждения при инсульте (Ishikawa M. *et al.*, 2004). Показано, что полиморфноядерные лейкоциты, среди которых преобладают нейтрофилы, в значительной степени вовлечены в процесс ухудшения исхода инсульта (Woodruff T.M. *et al.*, 2011).

Нейтрофилы оседают на эндотелии ишемизированной сосудистой сети головного мозга в острой фазе после инсульта и проникают в паренхиму головного мозга (Yilmaz G., Granger D.N., 2010; Barone F.C. *et al.*, 1992; Price C. *et al.*, 2004; Stowe A.M. *et al.*, 2009). Имеются экспериментальные данные о том, что грызуны со сниженными циркулирующими нейтрофилами (благодаря использованию антинеитрофильной сыворотки) демонстрируют

уменьшение объема инфаркта и более благоприятные неврологические исходы, что также указывает на патогенную роль накопления и активации нейтрофилов после инсульта (Hudome S. *et al.*, 1997). Напротив, патофизиологическое значение рекрутирования лимфоцитов в мозг после ишемического инсульта остается неопределенным. Однако недавние исследования показали важную роль Т-лимфоцитов в опосредовании реперфузионного повреждения ткани головного мозга после ишемии (Arumugam T.V. *et al.*, 2005; Yilmaz G. *et al.*, 2006). Как лимфоциты и нейтрофилы могут взаимодействовать в патофизиологии инсульта, пока неизвестно.

Экспериментальные исследования последнего десятилетия продемонстрировали, что несколько новых механизмов также играют важную роль в повреждении головного мозга, вызванного ишемическим инсультом. Так, было показано, что новый специфичный для ЦНС белок панкортин-2 взаимодействует с актин-модулирующим белком, белком синдрома Вискотта-Олдрича, гомологичным верпролину-1 (WAVE1), и Bcl-xL, образуя митохондриально-ассоциированный белковый комплекс, который ослабляет апоптоз нейронов во время фокальной ишемии головного мозга во взрослых нейронах коры головного мозга (Cheng A.W. *et al.*, 2007). Также показано, что нейроны ЦНС экспрессируют несколько Toll-подобных рецепторов (TLR) и что активируемый TLR проапоптотический сигнальный каскад, включающий N-концевую киназу (JNK) и фактор транскрипции AP-1, возникает во время ишемического инсульта и опосредуется TLR 2 и 4 (Tang S.C. *et al.*, 2007; Arumugam T.V. *et al.*, 2009). Другие рецептор-опосредованные сигнальные механизмы активируются во время ишемического инсульта, также включают трансмембранные рецепторы Notch и адипонектин (Arumugam T.V. *et al.*, 2006; Thundyil J. *et al.*, 2010; Choi Y.H. *et al.*, 2010). Имеются данные, что гамма-секретаза и адипонектин-опосредованная передача сигналов через соответствующие рецепторы клеточной поверхности NOTCH-1 и ADR-1 (адипонектин рецептор-1),

усиливали апоптоз нейронов во время фокального ишемического инсульта (Arumugam T.V. *et al.*, 2006; Thundyil J. *et al.*, 2010; Choi Y.H. *et al.*, 2010).

В совокупности эти результаты демонстрируют, что существует множество путей, влияющих на исход инсульта, и существует множество механизмов, которые еще предстоит изучить в качестве новых потенциальных терапевтических мишеней для терапии инсульта.

1.2.3 Концепция нейроваскулярной единицы

После ряда неудач крупномасштабных клинических испытаний нейропротекторов в последние десятилетия, стало ясно, что необходимы новые подходы к терапии инсульта и фокус исследований и лечения несколько сместился (Ayer A. *et al.*, 2012; Lo E.H. *et al.*, 2004). С внедрением эффективных стратегий реперфузии, внутривенный тромболизис и тромбэктомия стали наиболее распространенными методами лечения, назначаемыми пациентам с инсультом. В настоящее время использование активатора плазминогена тканевого типа (tPA) состоит из общепринятого метода лечения, который наиболее эффективен при введении в течение 4,5 часов после острого ишемического инсульта (ИИ). К сожалению, он применим только к ограниченному числу пациентов из-за строгого временного интервала лечения tPA. Таким образом, срочно требуется предоставление других эффективных методов лечения (Lambertsen K.L. *et al.*, 2019).

Нейроваскулярная единица (НВЕ) - новаторская концепция, состоящая из множества компонентов, включающая нейроны, глиальные клетки, сосудистые клетки (эндотелиальные клетки, перициты, гладкомышечные клетки и матрикс базальной пластинки в сосудистой сети головного мозга (Lo E.H., Rosenberg G.A. 2009; Zlokovic B.V., 2011). Идея возникла на первом заседании Stroke Progress Review Group meeting Национального института неврологических расстройств и инсульта (National Institute of Neurological Disorders) и Национального института здравоохранения (Stroke of the National

Institutes of Health) в 2009 году и представляет собой концептуальную основу, включающую нейроны и прилегающую сосудистую сеть. В настоящее время признано, что взаимодействие между различными компонентами НВЕ очень важно (Lo E.H., Rosenberg G.A. 2009). Концепция о нейроваскулярной единице подчеркивает уникальную перекрестную связь между нейронами и сосудистой сетью головного мозга и ключевую роль, которую играют НВЕ играет в прогрессии ишемического инсульта (Iadecola C., 2017). ГЭБ и церебральный кровоток строго контролируются НВЕ, таким образом поддерживая гомеостатическое микроокружение мозга (Zlokovic B.V., 2011; Armulik A. *et al.*, 2010). Эндотелиальные клетки образуют высокоспециализированную мембрану вокруг кровеносных сосудов (Armulik A. *et al.*, 2010). Перициты в центральной нервной системе способствуют как нейрогенезу, так и васкулогенезу, а перициты, локализованные в кровеносных сосудах, могут действовать как мультипотентные сосудистые стволовые клетки (Armulik A. *et al.*, 2010; Nakagomi T. *et al.*, 2011; Karow M. *et al.*, 2012; Ahmed T.A. *et al.*, 2020; Tachibana M. *et al.*, 2018; Nakagomi T., *et al.*, 2015). Потеря перицитов приводит к снижению экспрессии специфических белков плотного соединения (TJ-белки) и последующему разрушению ГЭБ (Bell R.D. *et al.*, 2010). Известно, что астроциты протягивают концевые отростки к перицитам и гладкомышечным клеткам, регулируя их сжатие и расслабление, тем самым регулируя мозговой кровоток (Janzer R.C., Raff M.C., 1987; Zonta M. *et al.*, 2003). Астроциты также регулируют баланс синаптического глутамата частично посредством колебаний уровня Ca^{2+} в качестве своевременного ответа на изменения ионов и метаболизма в нейрональных клетках. Хотя классическое определение нейроваскулярной единицы не включает микроглию и олигодендроциты, структурно и функционально они тесно связаны с НВЕ. Олигодендроциты не только продуцируют нейротрофические факторы, но и формируют миелиновые оболочки, которые поддерживают передачу потенциалов действия (Kuhn S. *et al.*, 2019). Кроме того, они также могут служить в

качестве антигенпрезентирующих клеток (Harrington E.P. *et al*, 2020). Как иммунные клетки в ЦНС, микроглия может модулировать врожденный иммунитет астроцитов, высвобождая различные сигнальные молекулы (Kirkley K.S. *et al.*, 2017; Liu L.R. *et al.*, 2020). Таким образом, все компоненты нейроваскулярной единицы структурно тесно связаны и являются неотъемлемой частью функции для сохранения гомеостаза мозга.

В соответствии с современными представлениями патофизиологические процессы ишемического инсульта включают 3 стадии: а) сверхострая фаза (от минут до 6 часов); б) острая и подострая фаза (от часов до 7 дней); и в) хроническая фаза. Во время повреждения и воспаления одновременно активируются эндогенные защитные и репаративные механизмы, и соотношение этих активностей определяет исход ишемии (Stamatovic S.M. *et al.* 2019). Нейроваскулярная единица играет в патогенезе ИИ решающую роль на всех стадиях, которая по мнению ряда авторов складывается из - регуляции ГЭБ, сохранения клеток, воспалительного иммунного ответа и репарации во время ишемического повреждения или после него. Именно поэтому сейчас активно обсуждается влияние нейроваскулярной единицы на регуляцию гематоэнцефалического барьера, сохранение клеток, воспалительный иммунный ответ и восстановление сосудов нервной системы во время или после ИИ, а также регуляцию НВЕ некодирующими РНК (нкРНК). Наконец, рассматриваются существующие терапевтические подходы и перспективы лечения ишемического инсульта, нацеленные на НВЕ (Wang Q. *et al.*, 2020).

1.2.3.1 Регулирование гематоэнцефалического барьера при ишемии

Функция ГЭБ зависит от специфических белков плотного соединения (ТJ-белки) между эндотелиальными клетками и периваскулярным микроокружением. В острой фазе, следующей за началом ишемии, дисфункция НВЕ непосредственно способствует разрушению ГЭБ. Например, снижение экспрессии определенных белков (например – клаудина

и кадгерина) усиливает проницаемость ГЭБ и увеличивает риск возникновения вазогенного церебрального отека (Stamatovic S.M. et al. 2019; Sladojevic N. et al., 2019). Кроме того, перициты в дальнейшем дополнительно способствуют развитию отека головного мозга путем трансформации в провоспалительный фенотип (Stamatovic S.M. et al., 2019). Глиальные клетки могут способствовать разрушению ГЭБ при помощи матриксных металлопротеиназ (MMPs), которые разрушают матриксные белки ГЭБ (Mun-Bryce S., Rosenberg G.A., 1998; Seo J.H., et al. 2013). Кроме этого, есть данные, что тканевой активатор плазминогена (tPA) (Embersson J. et al., 2014; Li Y., et al. 2019), сам может активировать матриксные металлопротеиназы, еще больше усугубляя разрушение ГЭБ, которое не только способствует развитию нейровоспаления и отека, но и увеличивает риск церебрального кровоизлияния у пациентов, получавших тромболизис (Shi Z. S. et al., 2018; Wang W. et al., 2015). Поэтому, чтобы предотвратить дальнейшее развитие ИИ, защита ГЭБ должна быть главным приоритетом. Есть данные, что перлекан (Perlecan, PLC), также известный как специфичный для базальной мембраны гепарансульфатный протеогликановый белок является основным белком базальной мембраны, экспрессия которого повышена после ИИ у мышей. Показано, что PLC, присоединяясь к перицитам и эндотелиальным клеткам, способствует миграции перицитов через интегральный белок $\alpha 5 \beta 1$ посредством передачи сигналов PDGFR β (рецептор тромбоцитарного фактора роста), впоследствии регулируя восстановление ГЭБ (Nakamura K., 2019). Передача сигналов PDGFR- β также регулирует рекрутирование перицитов в очаги повреждения, способствуя восстановлению ГЭБ (Shen J. et al., 2019; Kim Y. et al., 2020).

1.2.3.2 Воспалительный иммунный ответ

Глиальные клетки являются ключевыми компонентами ЦНС (von Bartheld C.S. et al., 2016; Pelvig D.P. et al., 2008). В начале инсульта

астроциты немедленно активируются молекулами, высвобождаемыми из ядра ишемического повреждения (Amantea D. *et al.*, 2015). Они секретируют провоспалительные факторы и металлопротеиназы, которые разрушают ГЭБ, с одной стороны, а также нейротрофические факторы, которые защищают участки ишемии (Amantea D. *et al.*, 2015). В моделях церебральной ишемии-реперфузии на мышах показано, что сверхэкспрессия IL-15 в астроцитах усиливает эффекторные функции CD8⁺ Т и NK-клеток и, таким образом, усугубляет ишемическое повреждение головного мозга (Lee G.A. *et al.*, 2018). В ответ на инсульт количество иммуносупрессивных регуляторных Т-клеток (T_{reg}) и уровни провоспалительных IL-33 и CCL1, полученные из астроцитов, повышаются. Повышенные уровни амфирегулина, секретируемого T_{reg}, дополнительно регулируют пути IL-6 и STAT3, тем самым улучшая показатели функционального дефицита (Xu S. *et al.*, 2020; Ito M. *et al.*, 2019).

Микроглия также имеет как про-, так и противовоспалительные фенотипы (M1 и M2 соответственно) и быстро реагирует на ишемию. По данным Xu S. *et al.*, 2020; Wang Q-S. *et al.*, 2020, в течение первых суток после ишемии пролиферация и активация микроглии вызвали сильную воспалительную реакцию (повышенная регуляция TNF, IL-1 β и IL-6), вызывая серьезное повреждение ткани мозга ЦНС. Защитные цитокины, такие как нейротрофический IGF-1, секретируются клетками микроглии через несколько дней после начала ишемии, способствуя восстановлению и выживанию нейронов (Lalancette-Hébert M. *et al.*, 2007). Показано, что ингибирование активации микроглии ингибиторами комплемента может защитить стрессовые нейроны и уменьшить нейровоспаление на мышинной модели (Alawieh A. *et al.*, 2018). Напротив, если лечение антагонистом CSF1R уменьшает микроглию и увеличивает количество нейтрофилов, повреждение головного мозга у мышей становится еще более серьезным (Otxoa-de-Amezaga A. *et al.*, 2019). Регуляторными факторами интерферона (IRF) являются регуляторы активации макрофагов. Снижение уровня IRF4

приводит к повышенной экспрессии IRF5, что, в свою очередь, усиливает активацию M1, что приводит к усилению провоспалительного ответа и плохому прогнозу инсульта. Напротив, снижение IRF5 помогает усилить активацию M2, подавляет провоспалительную реакцию и способствует функциональному восстановлению (Al Mamun A. *et al.*, 2020). Активированная микроглия и их фрагментированные митохондрии индуцируют трансформацию астроцитов в реактивные астроциты A1. В них отсутствует большая часть нормальных астроцитов функции и являются нейротоксичными для нейронов и зрелых дифференцированных олигодендроцитов (Liddelow S.A. *et al.*, 2017; Joshi A.U. *et al.*, 2019). Интересно, что астроциты также секретируют цитокин - интерлейкин-33 (IL-33), который, в свою очередь, способствует ремоделированию синапсов микроглии.

1.2.3.3 Восстановление целостности нейроваскулярной единицы

Эндотелиальные клетки первыми повреждаются при ишемических поражениях головного мозга. Целостность специфических белков плотного соединения (TJ) между эндотелиальными клетками может быть усилена перицитами за счет секреции нейротрофического фактора, происходящего из глиальных клеток (GDNF) и ангиопоэтина-1 (Ang-1), который в конечном итоге защищает эндотелиальные клетки от некроза. Предварительная обработка нейтрализующими антителами Ang-1 блокирует перицит-индуцированную повышенную регуляцию TJ - белков (Wang Y.L. *et al.*, 2007).

Различные нейротрофические факторы экспрессируются перицитами, включая нейротрофический фактор головного мозга, фактор роста нервов и нейротрофин-3, которые обеспечивают нейропротекторные эффекты и облегчают регенерацию нейронов и аксонов в ответ на ИБ (Shimizu F. *et al.*, 2012; Arimura K. *et al.*, 2012). Есть данные, что после удаления перицитов дифтерийным токсином потеря плеiotропина, секретируемого перицитом

фактора роста, обеспечивающего нейротрофическую поддержку, приводит как к быстрой потере нейронов, так и нарушению мозгового кровотока и приводит к повреждению ГЭБ у мышей. Мыши с делецией *Swell 1*, специфичной для астроцитов, демонстрировали ремиссивную глутаматзависимую нейрональную возбудимость и повреждение головного мозга после ИИ (Nikolakoroulou AM. et al., 2019; Yang J. et al., 2019). Кроме того, реактивные астроциты ограничивают миграцию нейронов к поражению головного мозга ИИ посредством прямого контакта, в то время как новые нейроны, расположенные близко к поражению, способствуют функциональному восстановлению за счет усиления Slit-Robo-сигналикации (Kaneko N. et al., 2018).

После острой фазы ишемии воспалительная реакция в пораженной области начинает уменьшаться, а восстановление тканей начинает усиливаться. Хотя реактивные глиальные клетки вредны на ранней стадии, реактивные астроциты также играют роль фагоцитарного фенотипа в поглощении клеточного «мусора», чтобы помочь восстановлению повреждения мозга через ABCA1-опосредованный путь. Впоследствии образовавшиеся глиальные рубцы все еще могут препятствовать выпячиванию аксональной почки из-за обширной экспрессии ингибиторы регенерации аксонов (такие как протеогликаны хондроитинсульфата). С другой стороны, интактная ткань мозга изолируется от поврежденной области, чтобы свести к минимуму увеличение повреждений и воспаления (Faulkner J.R. et al., 2004). Морфология астроцитов после 2 ч временной окклюзии средней мозговой артерии у мышей показала, что ухудшение ультраструктуры астроцитов происходит намного медленнее, чем у нейронов, что указывает на то, что в условиях ишемии астроциты более устойчивы к повреждению, чем соседние нейроны (Gürer G. et al., 2009). В отсутствие астроцитов нейротоксичность глутамата проявляется при более низких концентрациях в коре головного мозга мышей (Rosenberg PA,

Aizenman E., 1989). Перициты служат критическими регуляторами во время ангиогенеза после ишемии через различные сигнальные пути, включая систему Ang/Tie, передачу сигналов VEGF, систему PDGF- β /PDGFR- β и передачу сигналов RGS5 (Cai W. et al., 2017).

Повышенная регуляция ephrinB2 благотворно влияла на восстановление сосудов ткани мозга после ишемии путем увеличения рекрутирования перицитов и эндотелиально-перицитарного взаимодействия клеток. Напротив, ингибирование экспрессии ephrinB2 в эндотелиальных клетках или перицитах приводит к ухудшению результатов (Ghori A. et al., 2017). Кроме того, изоформа-B фактора роста эндотелия сосудов также стимулирует восстановление нейроваскулярных структур, способствуя функции перицитов через VEGFR-1 (Jean LeBlanc N. et al., 2018). После умеренного снижения фиброза, вызванного перицитом, количество аксонов рафеспинального и кортикоспинального трактов увеличилось, что было пропорционально степени функционального восстановления после повреждения ЦНС (Dias D.O. et al., 2018) (рис. 1).

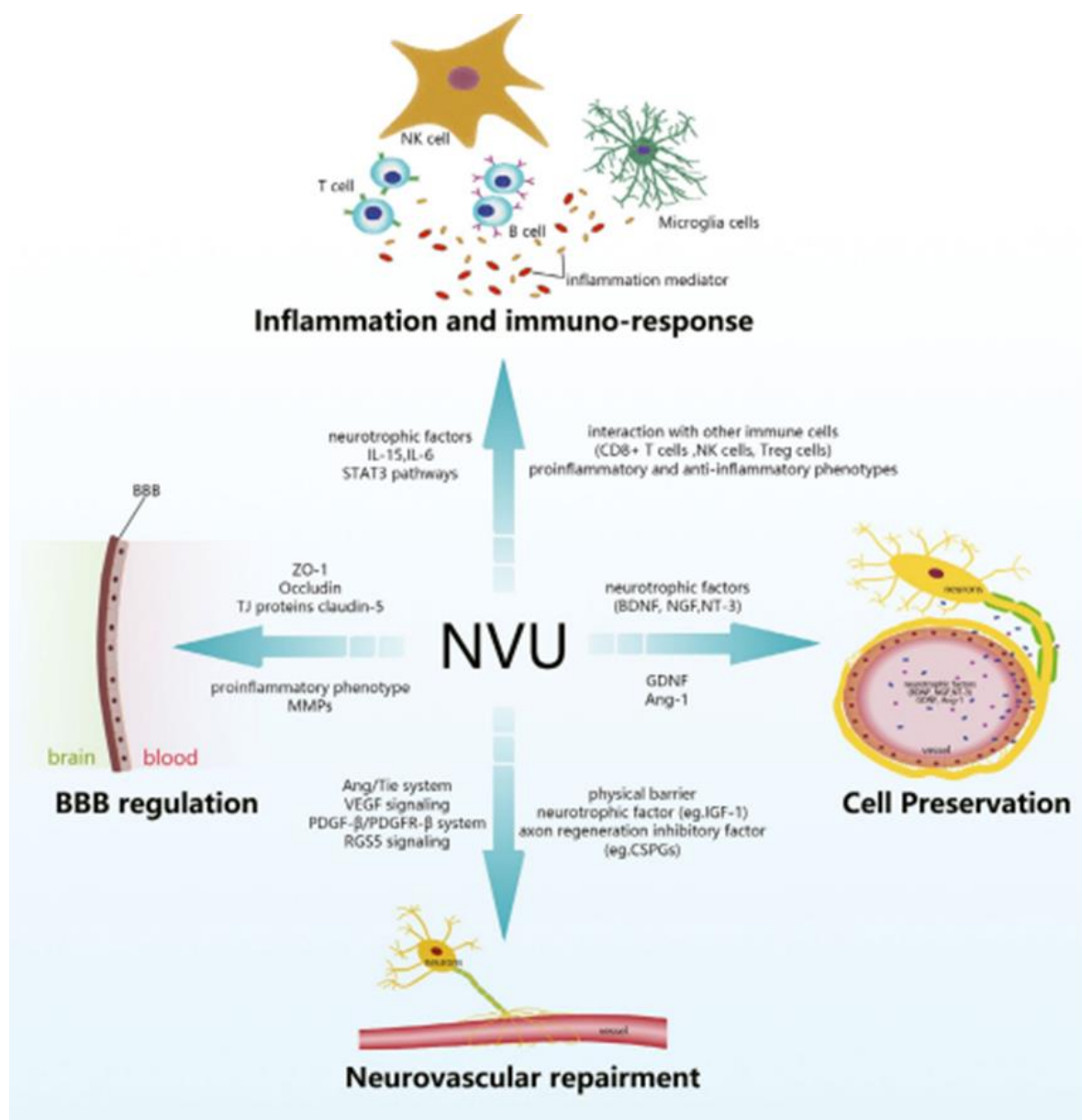


Рисунок 1.1. Роль нейроваскулярной единицы при ишемическом инсульте. Из материалов (Wang L. *et al.*, 2021, доступен по адресу: www.wileyonlinelibrary.com)

Таким образом, нейроваскулярная единица способна регулировать целостность ГЭБ, сохранность клетки, воспалительный иммунный ответ и восстановление во время или после ишемического инсульта. Она выделяет множество белков, предотвращающих разрушение ГЭБ и способствующих его функциональному восстановлению. Целостность системы НВЕ обеспечивает сильную поддержку сохранению клеток посредством тонкой регуляции нейротрофических факторов и последующих сигнальных путей. Интересно, что она играет свою решающую роль в качестве обоюдоострого

меча в воспалительных иммунных реакциях в ответ на ишемию, причем как про-, так и противовоспалительные фенотипы НВЕ быстро реагируют на ишемию. Ингибирование активации микроглии может защитить ЦНС от связанного с микроглией воспалительного иммунного ответа, однако использование антагонистов, ингибирующих активацию микроглии, будет блокировать последующее функциональное восстановление. Возросший рекрутинг перицитов и эндотелиальных клеток крайне полезен для восстановления сосудов мозга после ишемии, в то время как уменьшение фиброза, вызываемого перицитом, способствует исходу повреждения ЦНС.

1. 3 PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-1 γ coactivator-1 α)

PGC-1 α , открытый в 1998 году, широко исследовался и спустя десятилетие был признан ключевым регулятором биогенеза митохондрий, доставки и утилизации энергетических субстратов и, в целом, главным координатором аэробного метаболизма и энергетического гомеостаза клеток (Puigserver P. *et al.*, 1998; Puigserver P., Spiegelman B., 2003; Scarpulla R. *et al.*, 2012; Ventura-Clapier R. *et al.*, 2008). Эффекты PGC-1 α реализуются в результате коактивации транскрипционных факторов, контролирующих экспрессию белков энергопродуцирующей системы митохондрий (NRF1/2; nuclear respiratory factor), ферментов окисления жирных кислот (PPAR γ ; peroxisome proliferator-activated receptor), белков-транспортеров, факторов митохондриальной динамики, антиоксидантных ферментов, транскрипционных факторов NRF1, PPAR α , ERR α (estrogen-related receptor) (Cartoni R., 2005; Hong F., 2019; Rangwala R., 2007; St-Pierre J, 2006; Villena J., 2008; Ventura-Clapier R., 2008) (рис. 2). NRF1/2, ERR α , PPAR γ формируют транскрипционную систему регуляции энергетического гомеостаза тканей, ассистируемую PGC-1 α .



Рисунок 1.2. Процесс коактивации транскрипционных факторов, опосредуемый PGC-1α. Из материалов (St-Pierre J. et. al., 2006; Guo X. et al., 2014).

Исследования прошедшего десятилетия раскрыли новый аспект функциональной активности PGC-1α, заключающийся в трансляции широкого спектра нейропротекторных эффектов, поддержании функциональной активности нейронов и нейропластичности. Количество известных транскрипционных факторов, активируемых PGC-1α, составляет около двух десятков. Подавляющее большинство из них являются ядерными рецепторами, проявляющими сродство к липофильным небелковым лигандам (глюкокортикоиды, тиреоидные гормоны, эстрогены, андрогены, прогестерон, липидные метаболиты), функционирующими как плеiotропные регуляторы энергетического метаболизма и физиологии высокоэнергетических органов в условиях экстремальных воздействий, стрессов, гипонергетических состояний (высокие функциональные нагрузки, субстратная депривация, холодное воздействие, ишемия, гипоксия) (Canto C., 2009; Fernandez-Marcos P.J., 2011; Wei W., 2016).

Экспрессия PGC-1 α регистрируется в развивающемся мозге крыс, начиная с 15 эмбрионального дня, и усиливается в постнатальном периоде. PGC-1 α выявляется во всех популяциях нейронов в различных областях головного мозга, включая обонятельные луковицы, кору головного мозга, гиппокамп, стриатум, черную субстанцию (Cowell R., 2007; Tritos N.A., 2003).

В нервной системе PGC-1 α -зависимый биогенез митохондрий осуществляется сопряженно с разрастанием дендритов, формированием синаптических шипов и синаптогенезом (Cheng A., 2012; Wenz T., 2011). PGC-1 α , активируя NRF1, регулирует экспрессию NMDAR, GABAR и синаптическую пластичность (Dhar S., 2009; Li Z., 2018). PGC-1 α оказывает антиоксидантные, антиапоптотические, противовоспалительные, трофические эффекты, опосредует репаративную поляризацию макрофагов и микроглии, стимулирует ангиогенез и нейрогенез – механизмы, которые в совокупности, составляют основу выживания нервных клеток и повышения толерантности мозга к ишемии (Arany Z., 2008; Camandola S., 2017; Guo X., 2014; Eisele P.S., 2013; Lu Z., 2010; Nijland P.G., 2014; Shulga A., 2009; St-Pierre J., 2006; Valle I., 2005; Vats D., 2006). Широко признанная в нейробиологии определяющая роль транскрипционного фактора CREB в нейрорепаративных процессах и формировании толерантности нейронов к ишемии обусловлена, в значительной степени, его способностью связываться с CRE-сайтами в промоторе гена PGC-1 α и активировать его транскрипцию (Kitagawa K., 2007). PGC-1 α активируется главными сенсорами энергетического дефицита и окислительно-восстановительного состояния клетки (AMPK, SIRT1), интегрирует метаболическую и нейрогормональную информацию, модулирует пути выживания нейронов (Sano M., 2007; Petegnief V., 2013). В нервной системе синаптическая активность и приток кальция через GluRs запускают активацию Ca²⁺-кальмодулин (CaM)-зависимых киназ, Ras/MAPK-и AMPK-каскады, повышающие стабильность и активность PGC-1 α (Greer, 2008; Kitagawa K., 2007; Puigserver P., 2003).

Снижение экспрессии и активности PGC-1 α отмечается при возрастных нейродегенеративных заболеваниях и нормальном старении мозга (Anderson, 2009; Austin, 2012; Camandola S., 2017; Tsunemi T., 2012). Фенотип PGC1 α -нулевых мышей демонстрирует стриальную дегенерацию, очаги поражения в кортикальном слое V/VI моторной коры, прилежащего ядра, черной субстанции, гиппокампа (Lin J., 2004). Таким образом, транскрипционный коактиватор PGC-1 α реализует нейропротекторные эффекты многочисленных эндогенных сигнальных молекул (гормонов, нейротрофинов, метаболитов) и является крайне значимой мишенью фармакологических воздействий при лечении неврологических и нейродегенеративных заболеваний.

Несмотря на перспективы фармакологической модуляции активности PGC-1 α , существует проблема малочисленности фармакологических препаратов, способных стимулировать активность и экспрессию PGC-1 α . К настоящему моменту, несмотря на широкие экспериментальные исследования подходов к активации и индукции PGC-1 α , очень немногие фармакологические препараты исследованы на предмет модуляции PGC-1 α (Wenz T., 2009). В клинической практике применяют лишь несколько групп препаратов: (1) фибраты, тиозолидиндионы (агонисты PPAR γ ; индукция PGC-1 α) (Tenenbaum A., 2005; Semple R., 2006; Yki-Jarvinen H., 2004); (2) ингибиторы фосфодиэстераз (цилостазол, ролипрам) (Ryan M., 2013); ингибиторы ацетилхолинэстеразы, антидепрессанты, агонисты β 2-адренорецепторов (активаторы CREB, индукция PGC-1 α) (Kitagawa K., 2007; St-Pierre J., 2006; Wills L.P., 2012); (3) тиреоидные гормоны (агонисты TR, индукция PGC-1 α); (4) рибонуклеозид-5-аминоимидазол-4-карбоксамид (AICAR), метформин, статины (активаторы AMPK; фосфорилирование/активация PGC-1 α) (Jiang S., 2018; Merrill G.F., 1997; Zhou G., 2001); (5) растительные полифенолы, ресвератрол (активация SIRT1, деацетилирование/активация PGC-1 α) (Dasgupta B., 2007; Rasbach K.A., 2008). Тем не менее, фибраты, тиозолидиндионы (Consoli A., 2013; Brunmair

В., 2004), метформин (Selvin E., 2008), статины (Ohira M., 2012) обладают нейротоксическими эффектами и ограниченной способностью преодолевать ГЭБ. Таким образом, эффективные и безопасные фармакологические индукторы/активаторы PGC-1 α не представлены в схемах лечения неврологических заболеваний.

1.4 Экспериментальные модели ишемического инсульта

1.4.1 Общая характеристика моделей ишемии

Важным и ответственным этапом для экспериментального изучения инсульта является выбор модели. Стоит отметить, что все известные в настоящий момент экспериментальные модели инсульта обладают теми или иными недостатками (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001). Среди наиболее частых недостатков отмечают то, что модели не отражают гетерогенный характер заболевания, им не сопутствуют типичные для человека патологические процессы (артериальная гипертензия, атеросклероз, сахарный диабет и прочие), а также не применяется весь спектр мер, который имеет место в клинической практике. Существуют также сложности и при обработке результатов, а также в объединении результатов разных исследований, поскольку они могут быть достаточно разнородными (Wang-Fischer Y., 2009; Mergenthaler P., Meisel A., 2012). Основным требованием к моделям на животных, является максимальная приближенность поведенческих и морфологических нарушений, вызванных экспериментальной ишемией, к наблюдаемым у пациентов проявлениям.

В используемых сегодня большом количестве экспериментальных моделей, изучаются механизмы повреждения клеток путем исследования влияния ишемического повреждения на степень клеточного стресса или гибели клетки в каждой конкретно взятой модели. Тремя основными классами моделей инсульта на животных *in vivo* являются 1) глобальная ишемия, 2) фокальная ишемия и 3) гипоксия/ишемия. Последний способ, в котором окклюзия сосуда сочетается с гипоксией, используется только у

молодых животных (Cimino A, et al., 2005; Uchiyama Y. et al, 2008). Глобальный ишемический инсульт чаще всего вызывается множественной окклюзией сосудов и реже полной остановкой мозгового кровообращения. В моделях фокального ишемического инсульта для окклюзии наиболее часто выбирают среднюю мозговую артерию (СМА) (Nagel S. et al., 2008; Titova E. et al., 2009; Durukan A. et al., 2009). Для изучения инсульта у животных выбор обычно ограничивается лабораторными видами, например, грызунами. Существует много преимуществ использования мелких животных, таких как крысы и мыши, в моделях инсульта. Эти виды относительно недороги, и их анатомия черепного кровообращения похожа на человеческую (Woolsey T.A. Et al., 1996). Также можно контролировать тяжесть, продолжительность и локализацию окклюзии сосуда. Физиологические факторы можно хорошо контролировать, а гистопатология позволяет оценить патогенез ишемии и предотвратить инфаркт миокарда.

Исследователями предпринимаются попытки создать оптимальную модель инсульта с целью возможного воспроизведения всех звеньев патогенеза и возможности их восстановления после повреждения, которые необходимо смоделировать для исследования лекарственных средств, новых технологий и тактик реабилитации. К основным требованиям к оптимальной модели относятся: 1) окклюзия сосуда (собственно ишемия), которую реализуют практически все современные модели инсульта; 2) нарушения в системе гемостаза (синдром гиперкоагуляции), которые пока не позволяет воспроизвести в полном объеме ни одна современная модель; использование модели с бенгальским розовым и облучением лазером приближает к поставленной задаче, но механизм гиперкоагуляции отличается от такового при инсульте; 3) сопутствующие инсульту состояния и заболевания, оказывающие влияние на работу головного мозга (сахарный диабет, артериальная гипертензия, ожирение, гиперлипидемия), что крайне тяжело достижимо на животных моделях; 4) отек головного мозга; 5) ремоделирование нервной ткани и дегенеративные постинсультные

изменения (крайне важный аспект для исследования потенциальных нейропротекторов и реабилитационных постишемических мероприятий, но общепринятых моделей этих постинсультных состояний у животных на данный момент не существует; 6) функциональные (неврологические) нарушения (дефицит), возникшие вследствие инсульта (парезы, потеря навыков передвижения, спастичность, нарушение речи и пр.), требуют от исследователя-экспериментатора тщательного анализа и создания новых методов наблюдения за животными, основанными на видовых особенностях; 7) последствия инсульта для всего организма (трофические нарушения гиподинамия, нарушение питания, синдром иммунодефицита и др.), имеются данные о развитии данных синдромов в эксперименте (Dirnagl U. 2010); 8) сосудистые события и их развитие в условиях различного физиологического состояния (Шмонин А.А. и др., 2017).

Учитывая опыт расхождения результатов экспериментальных и клинических исследований нейропротекторов с вышеобозначенными позициями, все еще остается актуальной проблемой необходимость создания новых моделей инсульта, пригодных для анализа эффективности нейропротекторов и реабилитационных мероприятий. Внимание исследователей привлекают различия многочисленных моделей ишемии, большинство из которых обеспечивает создание лишь неполной (глобальной или регионарной) ишемии, тяжесть которой может широко варьировать в зависимости от вида животного, индивидуального развития коллатералей, срока, прошедшего со времени создания ишемии (Шмонин А.А., 2011; Шмонин А.А., 2012).

Таким образом, по характеру нарушения мозгового кровотока модели ишемии мозга можно разделить на два типа: методы глобальной ишемии мозга, когда происходит нарушение кровообращения во всем мозге без формирования очага и методы фокальной ишемии мозга, при которой нарушается кровообращение в определенном участке мозга, ограниченном здоровой тканью (Wang-Fischer Y., 2009; Graham S.M. et al., 2004; Traystman

R.J., 2003). При фокальной ишемии обычно формируется очаг и можно выделить характерную зональность (ядро ишемии и перинфарктная зона - пенумбра). Также модели ишемии можно разделить на полную и неполную ишемию. В зоне полной ишемии кровотока не наблюдается, при неполной ишемии кровотоки сохраняются. Полнота окклюзии же определяет степень вовлеченности коллатерального кровообращения (Шмонин 2011; Шмонин 2012; Shmonin A.A. et al., 2012).

Модели фокальной ишемии мозга считаются наиболее подходящими для исследования потенциальных нейропротекторов, поскольку позволяют получить значимый неврологический дефицит и четко визуализируемый очаг повреждения (Ginsberg M.D., 2008). Наиболее используемыми моделями фокальной ишемии головного мозга в каротидном бассейне являются: 1) филаментная окклюзия средней мозговой артерии (СМА) по Коидзуми (Dirnagl U. et al., 2013; Longa E.Z. et al., 1989; Коржевский Д.Э. и др., 2009) — малоинвазивная модель ишемии, которая не требует трепанации черепа (Коржевский Д.Э. и др., 2012); 2) фототромбоз, для тромбообразования в кровеносное русло вводится светочувствительный краситель, а через интактный череп пропускается световой пучок. При взаимодействии фотосенсибилизатора бенгальского розового и пучка света повреждаются эндотелий сосудов, что инициирует адгезию и агрегацию тромбоцитов (Dirnagl U., 2010; Fisher M. et al., 2009; Watson B.D. et al., 1985). ; 3) эмболизация средней мозговой артерии (СМА); 4) манипуляции со СМА требуют выполнения трепанации черепа в проекции артерии (Dirnagl U., 2010; Fisher M. Et al., 2009, Шмонин А.А., 2011) — перевязка СМА (перманентная фокальная ишемия) , транзиторная окклюзия СМА на 30—40 мин (Chen S.T. et al., 1986; Полякова Е.А., и др., 2004), аппликация эндотелина-1 в проекции СМА (вазоспастическая модель ишемии мозга) (Windle V. Et al., 2006), перевязка СМА и обеих сонных артерий (перманентная фокальная ишемия), перевязка СМА с одновременным снижением артериального давления (АД) за счет депонирования крови в

шприц (модель транзиторной ишемии) (Chen S.T. et al., 1986, 40, 41], окклюзия СМА и гомолатеральной общей сонной артерии (перманентная фокальная ишемия), перевязка СМА и обеих сонных на 40 мин (транзиторная фокальная ишемия) [42]. В экспериментальных исследованиях модели, связанной с манипуляциями на сонных и СМА у крысы, продемонстрировали, что наиболее воспроизводимым методом является перевязка СМА и одновременная окклюзия обеих общих сонных артерий на 40 мин, позволяющие получить значимый однородный неврологический дефицит и размер инфаркта [23, 29]. Модели, связанные с изолированной перевязкой СМА или совместной перевязкой СМА и гомолатеральной СМА, не позволяют получить значимый неврологический дефицит и большой размер инфаркта [23, 32]. Модели ишемии в вертебрально-базилярной системе менее распространены из-за несовершенства методологии и трудности воспроизведения, поэтому они используются крайне редко.

Методы глобальной ишемии мозга [McConnell V.C., 2000] используются для разработки интраоперационных нейропротекторов, поскольку этот патогенетический вариант ишемии чаще встречается как проявление периоперационного инсульта или послеоперационных когнитивных нарушений. В отечественной литературе представлены следующие наиболее используемые и интересные модели общей ишемии мозга (Цыган Н.В., 2014): 1) четырехсосудистая модель — перевязка позвоночных и сонных артерий (Щербак Н.С., 2011); 2) окклюзия обеих сонных артерий у животных с незамкнутым виллизиевым кругом, например у монгольской песчанки (Биленко М.В., 1989) - 3) окклюзия обеих общих сонных артерий у крыс в сочетании с управляемой гипотензией (Chen S.T. et al., 1986; Chen J. et al., 1997; Биленко М.В., 1989); 4) декапитация; 5) остановка сердца животного. Некоторые авторы считают, что модель общей ишемии не может быть рассмотрена как основной метод для тестирования нейропротекторов и предназначена для решения отдельных экспериментальных задач, связанных с разработкой интраоперационной

защиты от ишемии мозга (Цыган Н.В., 2014). Распространенной моделью экспериментального ишемического инсульта для тестирования нейропротекторов является филаментная окклюзия СМА у крыс или мышей, выполненная по методу Коидзуми (Koizumi J. et al., 1986). Использование этой модели для изучения нейропротективных вмешательств считается оптимальным. При разной продолжительности окклюзии можно получить повреждения разных зон головного мозга. Так, при использовании 30-минутной окклюзии СМА можно смоделировать преимущественное повреждение области стриатума [35, 36]. При более длительной ишемии, повреждение распространяется на все области, включая кору головного мозга. Современные представления о патогенезе ишемического инсульта свидетельствуют, что размер инфаркта мозга зависит не только от продолжительности ишемии, но также от дополнительных факторов (Dirnagl U., 2010; Albers G.W. et al., 2011). Следует отметить, что временные рамки терапевтического окна могут отличаться у человека и животного, поскольку многие физиологические процессы протекают с разной скоростью.

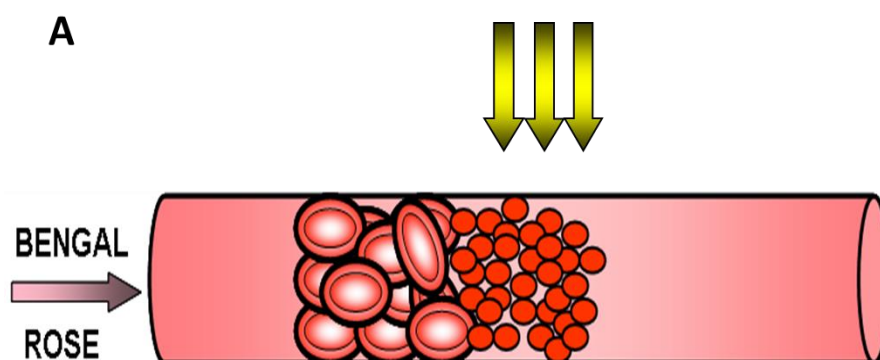
Терапевтическое окно для нейропротекторов с разными механизмами действия может отличаться, поскольку зависит от активности физиологических процессов на различных этапах ишемического или вторичного постишемического повреждения. Кроме того, сопутствующие состояния и заболевания могут также влиять на временные рамки терапевтического окна. В рекомендациях STAIR (Albers G.W. et al., 2011) приводится список важных вопросов, которые следует учитывать при планировании исследования на моделях инсульта: 1) при исследовании фармакологических средств следует использовать адекватную дозу препарата; 2) следует приводить доказательства того, что препарат достигает мишени, т.е. попадает в зону ишемии; 3) рекомендуется соблюдать терапевтическое окно; 4) эффективность должна быть исследована прежде на молодых здоровых животных-самцах с использованием перманентной ишемии, а затем на пожилых; 5) вначале исследования проводятся в

отношении ствола и белого вещества, далее в отношении серого вещества головного мозга; 6) проявившие эффективность препараты проверяют дополнительно в сериях с самками, пожилыми животными, животными с коморбидными состояниями (гипертензия, диабет, гиперхолестеринемия); 7) целесообразно проводить диффузионную и перфузионную магнитно-резонансную томографию и исследование сывороточных маркеров повреждения для оценки эффективности препаратов (Canazza A. Et al., 2014); 8) проверка взаимодействия с наиболее часто используемыми препаратами базовой терапии может снизить риск нежелательных явлений при комбинированной терапии, которая часто бывает в реальной клинической практике и др.

1.4.2 Фотоиндуцированный тромбоз сосудов головного мозга крысы

Среди моделей фокальной ишемии особое внимание привлекает метод фотоиндуцированного тромбоза, предложенный Watson B. 1985 году, воспроизводящий острое нарушение мозгового кровообращения, в результате которого образуется локальный ишемический инфаркт в коре головного мозга. Модель фототромбоза, позволяет избирательно исследовать когнитивные расстройства (Watson B., 1985). Для этой модели характерно «выключение» концевых отделов артериального русла (артериол и капилляров) (Барсков И.В., 1994; Andrews R., 1992; De Ryck M., 1990; Van Reepst J., 1994). При быстро развивающейся недостаточности кровоснабжения в очаге ишемии, прежде всего в нейронах, возникают некробиотические повреждения, где наряду с простым цитолизом и острым набуханием можно выявить нейроны с гиперхроматозом и тяжелыми деструктивными процессами. В этот период в пограничной с некротическим очагом зоне (пенумбре), помимо отека, отмечаются изменения нейронов, где наряду с погибшими (ацидофильными) клетками присутствуют нормальные неизмененные нейроны, а также гиперхромные нейроны, которые на более поздних сроках либо восстанавливаются, либо погибают. Особый интерес

связан с тем, что модель отвечает практически всем требованиям, предъявляемым к экспериментальным моделям фокальной ишемии головного мозга. Методика воспроизведения ишемической патологии при помощи фототромбоза хорошо отработана и широко представлена в зарубежной литературе. Большим преимуществом перед другими моделями является то, что эта модель неинвазивна, не требует трепанации и, таким образом, более точно воспроизводит клиническую патологию, возникающую при тромбозе сосудов головного мозга. В результате взаимодействия фоточувствительного красителя и фокусированного света выделяется синглетный молекулярный кислород (1.3 А), что приводит к повреждению эндотелия сосудов, адгезии тромбоцитов, их дегрануляции и агрегации, что в свою очередь вызывает тромботическую окклюзию поврежденных кровеносных сосудов с последующей ишемизацией снабжаемых ими тканей. Следует отметить, что повреждение эндотелия происходит лишь в тех сосудах, до которых возбуждающий свет, и площадь поражения при этом определяется размерами освещаемого участка (рис. 1.3 А, Б).



Б



Рисунок.1.3 Фотохимический тромбоз сосудов головного мозга. А-схематическое изображение действия бенгальского розового, Б-двусторонние ишемические очаги в префронтальной области головного мозга крысы

Таким образом, создается постоянный по объему и локализации очаг ишемического повреждения в определенной области мозга, а также окружающая очаг переходная область – пенумбра, где имеются погибшие, ишемизированные (гиперхромные) и неповрежденные нейроны (Романова Г.А., 1998; Astrup J. 1981; Van Reepits J., 1994).

1.5 Современные подходы к нейропротекции

Нейропротективная терапия получила популярность в последние 30 лет. За это время пройден сложный путь от изучения основных механизмов ишемического повреждения головного мозга, на защиту которого и направлена нейропротекция, до разработок различных стратегий эффективного лечения острого инсульта. До 1999 года инсульт, в основном, считался сосудистым заболеванием, вызванным окклюзией мозговых артерий, что приводило к повреждению нейронов. С 1999 года была введена

нейроваскулярная единица, включающая в себя - нейрон, микроглию, астроциты и эндотелиальные клетки и которая предполагает, что все уровни, связанные с ишемическим повреждением мозга, должны рассматриваться как интегрированные. В 2012 году нейроваскулярная единица была расширена до «сосудистой нейронной сети», что подчеркнуло внимание к венозной системе и предложило поддерживать рециркуляцию после инсульта (Xiao-Yi, 2018).

Этот подход открыл широкие возможности для повышения эффективности нейропротекторов путем реканализации, которая может быть достигнута с помощью эндоваскулярной терапии (Chamorro A., 2016; Goyal M, 2016). Однако, помимо положительных эффектов, реканализация окклюзированных артерий может также привести к реперфузионному повреждению сосудов и геморрагическим осложнениям. Кроме этого, процент больных, которым может быть проведен эффективный тромболизис и обеспечена адекватная реперфузия, в силу и объективных причин (короткий период терапевтического окна, структура тромба, наличие большого числа сопутствующих заболеваний), и организационных трудностей, пока невелик и только в 2-5% случаев пациенты с инсультом своевременно получают тромболитики, что не позволяет кардинально решить проблему эффективной терапии острого инсульта (Румянцева С.А. и др., 2008). Несмотря на эти ограничения, эндоваскулярное лечение по праву считается самым большим достижением в терапии инсульта за последние два десятилетия и входит в стандарты лечения пациентов с острым ишемическим инсультом (Goyal M, 2016).

Механизмы развития церебральной ишемии сегодня подробно изучены. Центр очага при ишемическом инсульте, как зона с минимальным уровнем, либо отсутствием кровотока, представляет собой так называемое «ишемическое ядро». В этой области кровоток истощается так, что нейроны погибают в течение нескольких минут. Вокруг ядра находится пенумбра или зона полутени - область, где снижен уровень кровотока, но нейроны

остаются жизнеспособными, благодаря коллатеральному кровоснабжению. Именно нейроны в области пенумбры и являются мишенью для нейропротекторов. Значительное количество накопленных данных позволило установить патофизиологические основы нейропротекции и выявить механизмы повреждения нервной ткани при ишемии, многие из которых стали потенциальными мишенями для стратегий терапевтического вмешательства.

Митохондриальная дисфункция является ранним и иницирующим событием в патофизиологии инсульта. Нарушение биоэнергетики и структуры митохондрий, аберрантная митохондриальная динамика играют ключевую роль в активации сигнальных путей гибели нейронов. Устранение поврежденных митохондрий (аутофагия) и замещение здоровыми является перспективным терапевтическим подходом к лечению ишемии (Yang J.L., Mukda S., 2018).

На сегодняшний день терапевтические тактики нейропротекции направлены на блокирование ключевых патогенетических звеньев «ишемического каскада», в контексте современного понимания приоритетной роли эффективной коррекции митохондриальной дисфункции в ограничении механизмов повреждения при церебральной ишемии. Обсуждаются возможности применения препаратов плеiotропного нейропротекторного действия, реализующих митохондриотропные защитные эффекты через модуляцию активности транскрипционного коактиватора PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-1 γ coactivator-1 α), контролирующего процессы биогенеза митохондрий, ангиогенеза, ферментативное звено антиоксидантной системы. Трансплантация митохондрий и клеток-доноров интактных митохондрий (мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки) составляет отдельную стремительно развивающуюся область митохондриотропной терапии.

1.5.1 Коррекция глутаматной эксайтотоксичности

Глутамат — один из основных возбуждающих нейротрансмиттеров в центральной нервной системе. В настоящее время глутамат рассматривается как медиатор, обеспечивающий множественный ответ нейрона на разнообразные физиологические и биохимические стимулы, которые реализуются через различные глутаматные рецепторы. В современных представлениях о нейробиологических и патофизиологических механизмах развития нейродегенеративных заболеваний ЦНС важная роль отводится нарушениям в глутаматергической системе мозга, в частности избыточному высвобождению возбуждающего нейротрансмиттера глутамата. Являясь быстрым нейротрансмиттером в структурах мозга, обеспечивающих механизмы памяти и обучения (кора больших полушарий, гиппокамп и ядра Мейнерта), глутамат в условиях ишемии может проявлять эксайтотоксические свойства и непосредственно участвовать в процессе нейродегенерации (Гусев Е.И. Скворцова В.И., 2001; Давыдова Т.В. и др., 2010).

Эксайтотоксичность возникает в результате чрезмерной или продолжительной активации рецепторов глутамата. Выделяют два основных типа глутаматных рецепторов: ионотропные и метаботропные. Особый интерес представляют ионотропные N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторы, активация которых в нормальных условиях связана с пластичностью структур центральной нервной системы и участвует в механизмах выживания нейронов, защите нейронов от апоптотической смерти при окислительном стрессе. Гиперактивация же ионотропных рецепторов глутамата приводит к входу Ca^{2+} в клетку; его высокая концентрация в цитоплазме запускает нейротоксические процессы, включающие разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях, активацию ряда ферментов (протеазы, липазы, фосфатазы,

эндонуклеазы, оксидазы), повреждающих нейроны, и нейрональную гибель (Давыдова Т.В. и др, 2010).

Антитела к глутамату являются эндогенными защитными факторами, вырабатываемыми в организме в ответ на избыточную продукцию глутамата, ведущую к гибели нейронов. Ранее было показано, что антитела к глутамату оказывают защитный эффект на нарушения памяти в условиях избыточной продукции глутамата. Интраназальное введение антител к глутамату в начальном периоде избыточной продукции глутамата, ведущей к дегенерации нейронов, оказалось эффективным в сохранении памятного следа у животных, обученных в тесте УРПИ (Романова Г.А., Шакова Ф.М., 2010). Можно предположить, что в механизмах действия антител к глутамату лежит их способность снижать избыточное содержание глутамата в структурах мозга, в частности, в префронтальной коре, гипоталамусе, гиппокампе, ядрах Мейнерта и, тем самым, защищать нейроны от гибели.

Применение неселективных антагонистов NMDA-рецепторов (NMDAR) сопровождается нежелательными и вредными побочными эффектами (когнитивные нарушения, галлюцинации, кома), что связано с тотальным подавлением активности участвующих в нейропротекции GluN2A-содержащих синаптических NMDAR и экстрасинаптических GluN2B-содержащих NMDAR, инициирующих эксайтотоксичность. Недавние исследования показали, что NMDAR (GluN2B) связаны с нейрональной NO-синтазой (nNOS) белком PSD-95 (белок-95 постсинаптической плотности) в сигнальный комплекс. Активация nNOS с последующей генерацией NO, медиатора глутамат-индуцируемой эксайтотоксичности, зависит от PSD-95 и от опосредованного рецептором NMDA (GluN2B) притока кальция. Ингибирование PSD-95 под действием пептида Tat-NR2B9с или малых молекул (ZLOO6, IC87201) предотвращает образование комплекса NMDAR/PSD-95/nNOS и тем самым уменьшает образование вредоносного NO. Другие ключевые физиологические функции

в ЦНС, опосредованные рецепторами NMDA, не затрагиваются ингибированием PSD-95. Это особенно важно, поскольку неудача предыдущих исследований антагонистов рецепторов NMDA была связана с побочными эффектами, обусловленными блокадой NMDAR-ассоциированного ионного потока и сигнальных путей выживания клеток. Было показано, что ингибирование PSD-95 не оказывает побочных эффектов, опосредованных рецептором NMDA, что делает эти соединения подходящей и безопасной терапией у пациентов. Показано, что ингибиторы PSD-95 снижают объем инфаркта на модели инсульта у мышей при введении до трех часов после начала ишемии. Помимо своей эффективности у грызунов, ингибирование PSD-95 проявило нейропротекторные свойства у нечеловеческих приматов, что позволяет их рассматривать как перспективные субстанции для лечения инсульта (Jayaraj R.L., 2019).

Не связанный с ингибированием NMDAR подход в коррекции глутаматной нейротоксичности предполагает применение агонистов пуринаргических рецепторов, которые регулируют уровни Ca^{2+} , снижают высвобождение глутамата и эксайтотоксичность после инсульта (Russo E., 2018). При инсульте показана способность таурина (β -аминокислота; обнаруживается в высоких концентрациях в возбудимых тканях; тормозный нейромодулятор) снижать токсичность глутамата, уменьшать окислительный стресс и нагрузку кальцием. Таурин как слабый агонист ГАМК-рецепторов, рецепторов глицина, может частично заменить ГАМК, вызывая торможение нейрональной возбудимости. Таурин выделяется из срезов мозга в ответ на стимуляцию глутаматных рецепторов, что необходимо для ограничения глутаматной токсичности, увеличения соотношения bcl-2/bad, подавления стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (Schaffer S., 2014).

Внимание многих исследователей привлекает феномен прекондиционирования различными факторами, при котором достигается состояние повышенной устойчивости к последующему повреждению,

обусловленное активацией эндогенных адаптивных механизмов. Показано, что применение сублетальных концентраций глутамата активирует через стимуляцию NMDA рецепторов эндогенные протективные механизмы мозга (NMDA прекондиционирование) против глутаматной цитотоксичности и различных повреждающих воздействий. Селективная фармакологическая активация этих механизмов рассматривается как перспективная терапия инсультов. Исследования на культуре нейронов показали, что нейропротекция с помощью NMDA-прекондиционирования связана с изменением экспрессии ряда белков, среди которых протеинкиназы, факторы транскрипции, ферменты антиоксидантной защиты (Архипов В.И., 2013).

1.5.2 Коррекция окислительного стресса при церебральной ишемии/реперфузии

Окислительный стресс признается ведущим патогенетическим механизмом в ишемическом повреждении мозга, поскольку вызывает окислительную модификацию, нарушение конформации и дисфункцию макромолекул, инициирует митохондриальный путь апоптоза и воспаление. Причины развития окислительно-восстановительного дисбаланса при ишемии/реперфузии заключаются, с одной стороны, в активации и индукции прооксидантных ферментов, а, с другой, в несостоятельности антиоксидантных систем (Simion A., 2019).

Глутаматная эксайтотоксичность при ишемии сопровождается кальциевой перегрузкой нейронов и кальций-зависимой активацией цитоплазматических АФК-продуцирующих ферментов, таких как НАДФН-оксидаза (NOX), нейрональная NO-синтаза (nNOS), ксантинооксидаза (ХО) (Jayaraj R.L., 2019; Simion A., 2019). При ишемии происходит диссоциация респирасом (суперкомплексов) дыхательной цепи митохондрий, сопряженная с гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), АФК-зависимым открытием в митохондриях неспецифической поры высокой проницаемости (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) и

деполяризацией (Genova M.L., 2014). Поддержание потенциала внутренней мембраны в этих условиях обеспечивается митохондриями за счет обращения активности АТФ-синтазы - выброса протонов из матрикса в межмембранное пространство, сопряженного с гидролизом гликолитического АТФ, обратным транспортом электронов в дыхательной цепи и продукцией АФК – механизма, известного как «АФК-индуцированная продукция АФК» (ROS-induced ROS release) (Zorov D.B., 2009).

Сравнительные исследования объемов продукции АФК прооксидантными ферментами в остром ишемическом периоде привели к заключению, что приоритетная роль в окислительном повреждении принадлежит семейству НАДФН-оксидаз, включающему семь изоформ, и митохондриальным источникам АФК (Yang J.L., 2018; Jayaraj R.L., 2019; Kim J.Y., 2017). При ишемии патологические эффекты NOXs, генерирующих супероксидный анион-радикал как целевой (не побочный) продукт реакции, обусловлены активацией: (1) фагоцитарной NOX2 в резидентных макрофагах ЦНС (микроглия) и рекрутированных из циркулирующей крови лейкоцитах; (2) NOX1, NOX2, NOX4, NOX5 в сосудах головного мозга и сопряженным повреждением ГЭБ; (3) NOX1, NOX2, NOX4, DUOX1 в нейронах и астроцитах (Jayaraj R.L., 2019, Kim J.Y., 2017). NOX5 проявляет срочную кальций-зависимую активацию и отвечает за ранние повреждающие эффекты (Casas A.I., 2019). NOX2, NOX4, DUOX1 значительно индуцируются в мозге в период с 24 ч до 72 ч после реперфузии на мышинных моделях окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) и определяют отсроченные повреждающие эффекты. Недавно было показано, что транскрипционный фактор провоспалительных/иммунных ответов NF- κ B активирует экспрессию гена каталитической субъединицы gp91phox всех изоформ NOX и, таким образом, применение фармакологических ингибиторов NF- κ B (аспирин) ограничивает индукцию NOX при инсульте (Kim J.Y., 2017).

Действие ингибиторов NOX основано на блокировании сборки активного ферментного комплекса (апоцинин) или конкурентном ингибировании (GSK2795039, GKT137831). Широко применяемые ингибиторы NOX не имеют селективного действия, могут ингибировать другие флавопротеины (дифенилен йодоний), оказывают токсические и нежелательные побочные эффекты (иммуносупрессия). Недавно созданный селективный пептидный ингибитор (Gp91ds-tat) NOX2 представляется наиболее перспективным и безопасным (Kim J.Y., 2017; Yang Q., Huang Q., 2019). Несмотря на патогенетически оправданное применение ингибиторов NOX, внимания заслуживает исследование по нокауту гена ключевой субъединицы (p22phox) NOX в генерации АФК, типичной для всех изоформ NOX. Оказалось, что нокаут не устранял продукцию АФК в нейронах и сопровождался слабым положительным эффектом на резистентность мозга к ишемии. Результаты были кардинально улучшены при совместном с нокаутом применении митохондриальных антиоксидантов, в частности, убихинона (Ngarashi D., 2019). Полученные данные свидетельствуют о том, что активация митохондриальной продукции АФК имеет критическое значение в повреждении нейронов, в которых содержание митохондрий может достигать 40% объема цитоплазмы (Yang J.-L., 2018).

Применение митохондриально-адресованных антиоксидантов, конъюгированных с липофильным катионом (триметилфосфоний, ТФФ), способных селективно потенциалзависимо накапливаться в митохондриях, оказывает выраженный защитный эффект при использовании существенно меньших концентраций препаратов. Вследствие адресной доставки внутримитохондриальное содержание таких антиоксидантов в тысячи раз превышает их уровень в цитоплазме. Примерами являются mitoQ (митохинон, убихинон-ТФФ), SkQ1 (пластохинонил-децил-ТФФ), растительный полифенол ресвератрол-ТФФ, mitoVitE (токоферол-ТФФ). MitoVitE был в 350 раз более эффективен в подавлении окислительного

стресса, чем «ненаправленный» антиоксидант витамин Е или его водорастворимый аналог trolox (тролокс) (Russo E., 2018; Skulachev V.P., 2013). Разработаны миметики супероксиддисмутазы (СОД) MitoSOD с низким молекулярным весом, высокой скоростью диффузии в митохондрию, отсутствием иммуногенности (Russo E., 2018).

Препараты селена (Se) повышают активность ключевых антиоксидантных ферментов клеток - глутатионпероксидазы (ГПО) и тиоредоксинредуктазы (ТР) - каталитический центр которых содержит Se в форме аминокислоты селеноцистеин (Sec). У человека и грызунов изоформа ГПО1 присутствует в нейронах и глиальных клетках во всех отделах мозга, а ГПО4 – в нейронах. Влияние соединений Se на клетки головного мозга состоит в повышении активности ГПО, снижении интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и защите клеток от гибели. Селенопротеин Р (SelP) – главный селенопротеин плазмы крови – поступает в мозг через рецептор-опосредованные механизмы и проявляет нейротрофическую активность (Savaskan N.E., 2012). Селенопротеин Н (SelH) – тиоредоксинподобный ДНК-связывающий белок, участвующий в регуляции генов, способствует экспрессии белков, которые усиливают антиоксидантную систему клетки, защищают нейроны от УФО-повреждения, предотвращают внутренний путь апоптоза, стабилизируют мембранный потенциал митохондрий, стимулируют митохондриогенез и митохондриальные функции (Savaskan N.E., 2012). Сверхэкспрессия SelH ограничивала продукцию АФК в культуре мышечных нейронов гиппокампа HT22 и предотвращала гибель клеток от глутамат-индуцированной смерти (Ma Y.-M., Guo Y.-Z., 2017). Предварительное введение селенита (0,2 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней) мышам, подвергнутым 60-минутной фокальной церебральной ишемии, уменьшало объем инфаркта головного мозга и снижало окисление ДНК (Mehta S.L., 2012). Такие препараты Se как селенит

и селенат Na, селенометионин могут быть востребованы в коррекции ишемического повреждения головного мозга (Ma Y.-M., Guo Y.-Z., 2017).

Нейротрофины способствуют выживанию нейронов посредством активации сигнального пути PI3K/Akt. Этот путь регулирует антиоксидантные механизмы, включая Cu/Zn-СОД, гем-оксигеназу 1, каталазу и ГПО. Через сигнальный путь PI3K/Akt/NFkB нейротрофины регулируют митохондриальную функцию, увеличивая экспрессию антиапоптотических белков. При удалении фактора роста нервов (NGF) из культуры нейрональных клеток PC12 в течение 24 ч отмечали значительное снижение жизнеспособности клеток, которому предшествовало усиление продукции АФК через 6 ч депривации и снижение мембранного потенциала митохондрий через 12 ч (Amara F., 2015).

В экспериментах на крысах исследовано нейропротекторное и антиамнестическое действие гексаметилендиамида бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина), ГК-2h, димерного дипептидного миметика человеческого NRF, при двустороннем фокальном фотоиндуцированном ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс. Установлено, что внутрибрюшинное введение ГК-2h приводило к уменьшению объема коркового инфаркта, а также сохраняло выработанный до инсульта условный рефлекс пассивного избегания (Гудашева Т.А. и др., 2012).

Растительные полифенолы, классически определяемые как антиоксиданты прямого действия, оказывают многосторонние потенцирующие влияния на антиоксидантную систему клетки: (1) инактивируют свободнорадикальные метаболиты (супероксидный анион-радикал, гидроксильный, алкоксильный, нитроксильный и др.); (2) хелатируют металлы переменной валентности; (3) оказывают опосредованное стимулирующее влияние на экспрессию генов антиоксидантных ферментов через активацию сиртуинов (SIRT1), транскрипционного коактиватора PGC-1 α и факторов транскрипции (ERR,

NRF2), причастных к экспрессии генов антиоксидантных ферментов. Наиболее активными растительными полифенольными антиоксидантами являются кверцетин, катехин (флавоноиды), а также ресвератрол, куркумин, гидрокситирозол (нефлавоноидные полифенолы) (Amara F., 2015, Uittenbogaard M., 2014).

1.5.3. Коррекция постишемического нейровоспаления

Некротическая гибель нейронов в очаге ишемии сопровождается высвобождением широкого спектра молекул, ассоциированных с повреждением, или DAMP (damage-associated molecular pattern). Инициация DAMP-зависимых механизмов воспаления направлена на элиминацию фагоцитами клеточного детрита в очаге инфаркта, сопровождается цитотоксическими эффектами и может вызывать вторичную гибель нейронов в пенумбре. Наиболее изученными и значимыми соединениями среди DAMP являются фрагменты нуклеиновых кислот, белок S100, ДНК-взаимодействующий белок HMGB1 (high-mobility group protein B1), которые селективно связываются с толл-подобными рецепторами (toll-like receptor, TLR) 2 и 4 микроглии (резидентные макрофаги ЦНС), астроцитов, эндотелиальных клеток, вызывают их активацию и последующее асептическое нейровоспаление. Активация глиальных клеток и эндотелиоцитов включает морфологические, фенотипические и метаболические изменения. Основными чертами активации микроглии (провоспалительный M1-фенотип) являются пролиферация, фагоцитоз, активация гликолиза, подавление митохондриального дыхания и митохондриогенеза, активация продукции АФК iNOS и NOX2, экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММП), провоспалительных цитокинов и хемокинов, необходимых в рекрутинге нейтрофилов крови (Jayaraj R.L., 2019, Yang Q., 2019).

Активация микроглии происходит быстро, в течение часа после начала инсульта, сопровождается увеличением количества нейтрофилов в очаге

инфаркта (через 2-4 ч), которое достигает пика между 1 и 3 днями и постепенно снижается в течение 15 дней. Нейтрофилам (микрофаги) отводится ключевая роль в механизмах воспалительного повреждения ишемического мозга: (1) адгезия нейтрофилов к эндотелию сосудов затрудняет микроциркуляцию и оксигенацию в околоишемических областях; (2) интенсивное потребление кислорода в ходе продукции АФК способствует обеднению ткани мозга кислородом, окислительному повреждению эндотелия и ГЭБ; (3) увеличение проницаемости ГЭБ под действием АФК и ММП сопровождается инфильтрацией макрофагов, моноцитов, лимфоцитов в очаг повреждения, что способствует реактивации воспалительного процесса; (4) секреция нейтрофилами эйкозаноидов, лейкотриенов, простагландинов, факторов активации тромбоцитов вызывают вазоконстрикцию и агрегацию тромбоцитов (Jayaraj R.L., 2019, Yang Q., 2019).

Таким образом, главными мишенями в ограничении развития воспалительного ответа могут быть TLR, рецепторы цитокинов и хемокинов. Способность ингибировать TLR2 и TLR4 была недавно обнаружена для блокаторов рецепторов ангиотензина II (валсартан) и статинов (флувастатин, симвастатин, аторвастатин) (Gao W., 2017). В качестве эффективной и безопасной стратегии подавления экспрессии TLR2 и TLR4 разрабатывается применение природных полифенолов, преодолевающих ГЭБ (ресвератрол, куркумин), производных флавоноидов (силимарин) и полифенолов, инкорпорированных в наночастицы (кверцетин) (Azam S., 2019). Антагонист рецептора IL-1 (IL-1ra) является противовоспалительным цитокином, естественным конкурентным антагонистом рецептора IL-1, блокирует все известные эффекты IL-1, включая воспалительную реакцию. IL-1ra пересекает ГЭБ как у крыс, так и у людей, вызывает значительное снижение объема инфаркта (на 40%) (Liu X., 2018).

Одним из наиболее перспективных современных подходов к коррекции воспаления является модуляция активности и экспрессии главного регулятора генетически-опосредованных провоспалительных/иммунных ответов транскрипционного фактора NF- κ B. NF- κ B контролирует активацию, дифференцировку, выживание иммунных клеток, активирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α , IL-6), ICAM1 (intercellular adhesion molecule-1), циклооксигеназы-2 (COX-2), iNOS, каталитической субъединицы gp91phox белков семейства NOX, MMP9. Недавние исследования продемонстрировали, что активацию NF- κ B потенцируют условия гипоксии и окислительного стресса, которые сопровождают острый, подострый период ишемии и воспаление. Таким образом, длительная неконтролируемая постишемическая активация NF- κ B приводит к развитию нерегулируемого нейровоспаления, отсроченной нейрональной гибели и диффузного поражения головного мозга (Jayaraj R.L., 2019; Liu T., Zhang L., 2017).

NF- κ B имеет димерное строение, связан в цитоплазме с ингибиторным белком (I κ B) в неактивный комплекс. Цитокиновая и/или DAMP-стимуляция активирует киназу I κ B (I κ B kinase, IKK), которая фосфорилирует ингибиторный белок, в результате чего комплекс NF- κ B–I κ B диссоциирует. I κ B убиквитинируется, деградирует в 26S протеасоме. NF κ B транслицирует в ядро, активирует транскрипцию генов провоспалительных белков (Liu T., Zhang L., 2017).

В настоящее время разработаны несколько категорий ингибиторов активации NF- κ B: (1) ингибиторы IKK (PS1145, аспирин, салицилат, кверцетин, лютеолин, генистеин, катехин, ресвератрол); (2) ингибиторы протеасом (бортезомиб, лактацистин); (3) блокаторы транслокации NF- κ B в ядро (такролимус); (4) ингибиторы ДНК-связывающей активности NF- κ B (глюкокортикоиды) (Liu T., Zhang L., 2017; Yahfoufi N., 2018).

Одной из мишеней NF- κ B является ген гипоксического фактора транскрипции HIF-1 α (hypoxia-inducible factor), контролирующего генно-опосредованные механизмы адаптации к гипоксии. HIF-1 α считается перспективной терапевтической мишенью из-за его влияния на многие сигнальные пути клеточного выживания, тем не менее, увеличивается количество доказательств, что HIF-1 α может индуцировать клеточную смерть в условиях тяжелой и продолжительной ишемии. HIF-1 α является главным фактором, который подавляет биогенез и дыхание митохондрий, активирует митофагию, что влечет уменьшение митохондриальной массы, снижение энергопродуцирующей функции митохондрий и толерантности клеток к ишемии. HIF-1 α активирует гены провоспалительных факторов (TLR4, iNOS, MMP), проапоптотических белков (Bnip3, Nix). В результате взаимодействия HIF-1 α с p53, p53 стабилизируется и активирует гены проапоптотических факторов. Ингибирование сигнальной оси NF- κ B/HIF-1 α может ограничивать пути воспаления, митохондриальной дисфункции, апоптотической гибели нейронов (Liu T., Zhang L., 2017; Russo M.A., 2019).

1.5.4 Коррекция митохондриальной дисфункции при инсульте

Митохондрии осуществляют энергопродукцию, участвуют в пластическом обмене, контролируют кальциевую и редокс-сигнализацию, выживание и гибель клеток, а митохондриальная дисфункция сопровождает неврологические заболевания и острые нарушения мозгового кровообращения, что, в целом, послужило основанием рассматривать митохондрию как критически значимую мишень для фармакологических воздействий при лечении нейропатологии. Митохондриальная дисфункция является ранним инициирующим событием в патофизиологии инсульта и характеризуется: (1) нарушением структуры и функции электрон-транспортной цепи; (2) деполяризацией; (3) избыточной продукцией АФК; (4) открытием неспецифической митохондриальной поры высокой проницаемости (mPTP); (5) высвобождением апоптотических факторов

(цитохром c, фактор, индуцирующий апоптоз (AIF)). Разработка эффективных подходов к коррекции митохондриальной дисфункции имеет решающее значение для выживания нейронов и неврологического улучшения, в связи с чем развивающаяся митохондриотропная терапия является перспективным нейропротекторным направлением в лечении инсульта (Yang J.L., 2018; Russo E., 2018; Liu F., Lu J., 2018).

1.5.5 Индукция биогенеза митохондрий

В нейронах суммарный объем митохондрий составляет 40% цитоплазмы. Высокие энергетические запросы нейронов связаны с поддержанием ионных градиентов, потенциала мембраны и возбудимости. Дисфункция митохондрий и энергетический дефицит провоцируют нарушение ионного гомеостаза, перегрузку нейронов ионами натрия и кальция, инициацию программ клеточной гибели. Таким образом, высокая активность механизмов контроля качества митохондрий (биогенез митохондрий и митофагия), эффективная регуляция баланса между потребностью в энергии и ее предложением, является основой выживания и функционирования нейронов, повышения их толерантности к условиям ишемии/гипоксии (Uittenbogaard M, 2014).

Церебральный митохондриогенез признается важнейшим звеном в эндогенных механизмах защиты нейронов при ишемически-реперфузионном повреждении, поскольку высокое содержание функциональных митохондрий обеспечивает поддержание внутриклеточного пула НАД⁺ и НАД⁺-зависимого гликолиза, секвестрацию ионов кальция, продукцию адаптогенных метаболитов (сукцинат, оксалоацетат), иницирующих механизмы локальной и системной адаптации к кислород-субстратной депривации (Farshbaf J.M., 2018; Liu F., Lu J., 2018; Кондрашова М.Н., 2002). Индукция биогенеза митохондрий рассматривается как новая терапевтическая стратегия, современный нейропротекторный подход в

лечении большинства нейродегенеративных заболеваний и острых нарушений мозгового кровообращения (Anzell A.R., 2018).

Биогенез митохондрий представляет собой процесс образования новых митохондрий в результате роста и деления предсуществующих, характеризующийся специфическими признаками: (1) скоординированный синтез митохондриальных белков, кодируемых митохондриальной (мтДНК) и ядерной ДНК; (2) синтез липидов, составляющих внутреннюю и наружную мембраны митохондрий; (3) репликация мтДНК; (4) формирование протяженных и/или разветвленных митохондриальных сетей (митохондриальный ретикулум); (5) формирование высокого мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий и эффективная продукция АТФ в ответ на энергетические потребности. В постмитотических нейронах биогенез митохондрий осуществляется ограничено в соме, обновление митохондрий в аксонах происходит в результате аксонального транспорта вдоль микротрубочек (Uittenbogaard M, 2014).

Механизмы регуляции биогенеза митохондрий в мозге остаются мало изученными. Тем не менее, принципы и закономерности индукции митохондриогенеза, хорошо известные для скелетных мышц, сердца, печени и жировой ткани, по-видимому, имеют универсальные черты. Основными триггерами биогенеза митохондрий являются: деление и репарация клеток, эмбриональное развитие, изменение в физиологическом состоянии (симпатическая стимуляция), ограничение калорий, гормональные сигналы (тиреоидные гормоны, глюкокортикоиды, адреналин, норадреналин, лептин, эритропоэтин), митохондриальные заболевания/повреждения, воспаление, гипоксия, ишемия, холодное воздействие, окислительный/нитрозативный стресс (Uittenbogaard M., 2014; Gureev A.P., 2019). Возраст-зависимое снижение тиреоидных, глюкокортикоидных, половых гормонов приводит к снижению скорости биогенеза и обновления митохондрий, уменьшению площади внутренней мембраны митохондрий, что сопровождается

снижением толерантности нейронов к воздействию ишемии/гипоксии (Bratic A., 2013).

В настоящее время в качестве ключевого внутриклеточного координатора биогенеза митохондрий рассматривают транскрипционный коактиватор PGC-1 α (proliferator peroxisome-activated receptor (PPAR) γ coactivator 1 α). PPAR γ был первым ядерным рецептором и транскрипционным фактором, активность которого увеличивалась в ассоциации с PGC-1 α и сопровождалась экспрессией генов ферментов окисления высших жирных кислот. Впоследствии было показано, что PGC-1 α активирует десятки транскрипционных факторов, причастных к энергетическому обмену, тканевому дыханию, окислительному фосфорилированию, ангиогенезу, антиоксидантной защите (ядерные респираторные факторы, nuclear respiratory factor, NRF1, NRF2; ядерные рецепторы, родственные рецептору эстрогена, estrogen-related receptor, ERR; рецепторы тиреоидных гормонов, ретиноидов, глюкокортикоидов, эстрогена). Главными в регуляции биогенеза митохондрий признаются ядерные респираторные факторы NRF1 и NRF2 (nuclear respiratory factor), которые играют интегративную роль в ядерно-митохондриальном взаимодействии, активируют экспрессию более 70% субъединиц ферментов энергопродуцирующей системы митохондрий и митохондриального фактора транскрипции TFAM (mitochondrial transcription factor A), необходимого для транскрипции и репликации мтДНК, определяющего количество копий мтДНК в митохондрии (Uittenbogaard M., 2014; Gureev A.P., 2019).

PGC-1 α интегрирует метаболическую и нейрогормональную информацию, контролирует генетический уровень адаптации митохондриальной массы и окислительного метаболизма к конкретным клеточным условиям и/или стадии развития (Uittenbogaard M, 2014).

Индукция PGC-1 α связана с: (1) активацией PPAR γ липидными агонистами; (2) увеличением уровня цАМФ, активацией протеинкиназы A и

фактора транскрипции CREB (β 3-адренергическая сигнализация); (2) увеличением продукции оксида азота и цГМФ (NO-сигнальный путь); (3) увеличением внутриклеточного уровня Ca^{2+} , активацией кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы (CaMK), которая активирует CREB; (4) активацией p38 MAPK, фосфорилированием/активацией фактора 2 энхансера миоцитов (MEF2) и фактора транскрипции ATF2, которые имеют сайты связывания в промоторе PGC-1 α (Gureev A.P., 2019, Bouchez C., 2019).

Активация PGC-1 α происходит на этапе посттрансляционной модификации путем фосфорилирования (AMP-активированная протеинкиназа; AMP-activated protein kinase, AMPK) и деацетилирования (silent information regulator 1, SIRT1; НАД⁺-зависимая деацетилаза). AMPK и SIRT1 являются главными детекторами энергетического дефицита и окислительно-восстановительного состояния клетки, активация которых происходит при снижении объемов продукции АТФ, увеличении содержания АМФ и НАД⁺ в клетке. Регуляторная ось AMPK/SIRT1/PGC-1 α признается определяющей в индукции биогенеза митохондрий и на нее направлена разработка эффективных и безопасных фармакологических модуляторов (Yang J.L., 2018, Uittenbogaard M., 2014).

Природными активаторами SIRT1 являются растительные полифенолы (ресвератрол, кверцетин, гидрокситирозол, куркумин), проявляющие антиоксидантные и противовоспалительные свойства (Bouchez C., 2019). Метиленовый синий, одобренный FDA для лечения нейродегенеративных заболеваний и инсульта, стимулировал биогенез митохондрий через изменение отношения НАД⁺/НАДН и активацию AMPK. Метформин и рибонуклеозид-5-аминоимидазол-4-карбоксамид (AICAR) являются активаторами AMPK (Russo E., 2018; Uittenbogaard M., 2014; Gureev A.P., 2019).

Для индукции PGC-1 α применяют доноры NO, фибраты, пиоглитазон (pioglitazone), росиглитазон (rosiglitazone) (агонисты PPAR γ), агонисты β 2-адренорецепторов, карнозин, эритропоэтин (Uittenbogaard M., 2014). Препараты селена увеличивают базовый уровень белков PGC-1 α и NRF1 в мозге животных, а также после ишемии и реперфузии (Mehta S.L., 2012).

Некоторые интермедиаты энергетического обмена (L-лактат, оксалоацетат) оказывают нейропротекторное действие и активируют церебральный митохондриогенез (Wilkins H., 2014). Новый ингаляционный анестетик севофлуран индуцировал экспрессию белков регуляторов митохондриогенеза (PGC-1 α , NRF1, TFAM) после глобальной ишемии мозга (Russo E., 2018). В целом, несмотря на многообещающие перспективы, связанные с индукцией и активацией PGC-1 α , очень мало фармакологических препаратов исследовано на способность положительно регулировать PGC-1 α и биогенез митохондрий, а некоторые индукторы митохондриогенеза (фибраты, метформин) оказывают нейротоксическое действие (Uittenbogaard M., 2014).

Известно, что увеличение в клетке уровня АФК и Ca²⁺, характерное для ишемии/реперфузии мозга, способствует, в случае непродолжительного воздействия, индукции и активации PGC-1 α , увеличению митохондриальной массы, но хронический выраженный окислительный стресс вызывает репрессию биогенеза митохондрий (Bouchez C., 2019). В настоящее время установлены основные закономерности митохондриогенеза в мозге при ишемических воздействиях разной тяжести и продолжительности. Известно, что кратковременная ишемия (30-минутная ОСМА) сопровождается снижением уровня мтДНК непосредственно после инсульта и последующим восстановлением до контрольного уровня через 4 ч реперфузии. Однако после 90-минутной окклюзии снижение содержания мтДНК не восстанавливается спустя 24 ч реперфузии (Chen H. et al, 2001). В другом исследовании окклюзия (120 минут) сопровождалась первичным снижением

уровня мРНК и белка ключевых регуляторов митохондриогенеза (PGC-1 α , NRF1, TFAM) с последующим восстановлением контрольного уровня через 24 ч реперфузии и дальнейшим ростом к 3 дню реперфузии, что коррелировало с динамикой содержания мтДНК. Таким образом, реперфузия может усиливать экспрессию PGC-1 α и биогенез митохондрий (Xie Y., Li J., 2014).

Митохондриальный биогенез активируется после церебральной ишемии/реперфузии, что позволяет считать биогенез митохондрий важным звеном репаративных механизмов (Xie Y., Li J., 2014). В модели «неонатальной ишемии-гипоксии» (120-минутная окклюзия общей сонной артерии, сменяющаяся продолжительным пребыванием в гипоксической среде (8% O₂; 2,5ч) уровень мтДНК и мРНК/белка регуляторов митохондриального биогенеза (NRF1, TFAM) увеличивался сопряженно через 24 ч. Раннюю положительную динамику маркеров биогенеза митохондрий авторы связали с возрастными особенностями мтДНК мозга новорожденных крыс (Yin W., 2008).

На модели эндотелин-1-индуцированного инсульта в ипсилезиальной моторной и сенсорной коре наблюдали устойчивое снижение содержания мтДНК (на 70% в течение 6 анализируемых дней), снижение кортикального уровня мРНК и белка ядерно- и митохондриально-кодируемых ферментов дыхательной цепи (на 25% мРНК NDUF51, на 50% мРНК COX1, ND1 в течение 6 дней). Инъекции эндотелина-1 вызывают воспроизводимые, очаговые ишемические поражения, которые имитируют подострое начало ишемии человека, со сниженным кровотоком в коре в течение 16 часов. Полученные данные свидетельствуют о нарушении транскрипционной регуляции митохондриальных белков энергопродуцирующей системы митохондрий после индукции эндотелином-1 церебральной ишемии. Таким образом, при длительной ишемии ткани мозга эндогенные механизмы индукции биогенеза митохондрий оказываются несостоятельными, что

требует применения фармакологических модуляторов митохондриогенеза (Yin W., 2008).

1.4.6 Ингибиторы mPTP

Пора, вызывающая переход мембраны митохондрий в состояние высокой проницаемости (mPTP, mitochondrial permeability transition pore) - белковый комплекс внутренней мембраны митохондрий (мегаканал), определяющий функциональное состояние митохондрий и выживаемость/гибель клеток. mPTP обеспечивает быстрый обмен между матриксом и цитоплазмой низкомолекулярных (не более 1,5 кДа) заряженных и электронеutralных молекул (ионов, метаболитов, кофакторов, сигнальных молекул, воды), что сопровождается снижением мембранного потенциала (Šileikytė J., 2019). mPTP имеет непосредственное отношение к регуляции потенциала внутренней мембраны митохондрий в условиях нормы и при патологиях. В физиологических условиях увеличение потенциала внутренней мембраны митохондрий сопровождается экспоненциальным ростом продукции АФК и АФК-зависимым открытием mPTP. В норме кратковременное открытие поры (мерцание, «flicker») ведет к быстрому умеренному сбросу мембранного потенциала, что защищает клетку от чрезмерного производства АФК. Известно, что открытие mPTP в 15% митохондрий нейронов не сопровождается инициацией программ клеточной гибели. В физиологических условиях длительное открытие поры блокируется молекулами АТФ/АДФ (Šileikytė J., 2019).

В условиях гипоксии/ишемии падение уровня АТФ, гиперпродукция АФК и перегрузка митохондрий ионами кальция индуцируют длительное неконтролируемое открытие mPTP и необратимую деполяризацию митохондрий (коллапс мембранного потенциала), что не только блокирует синтез АТФ, но и увеличивает потребление митохондриями цитозольного АТФ с целью поддержания потенциала, сопряженное с активацией производства АФК (АФК-зависимая гиперпродукция АФК), инициацией

деления и митофагии, развитием осмотического отека, разрывом наружной митохондриальной мембраны, высвобождением Ca^{2+} , АФК, проапоптотических факторов (cyt c, AIF). Таким образом, mPTP признается основным эффектором гибели клеток при различных патологиях. Открытие mPTP увеличивается с возрастом и является патогенетическим звеном в развитии нейродегенеративных заболеваний (Šileikytė J., 2019).

Несмотря на то, что исследования mPTP были начаты 40 лет назад, окончательное представление о структурных компонентах поры все еще не сформировано. До 2013 г. mPTP рассматривали как митохондриальный контактный сайт, формируемый внутренней и наружной мембранами. В образовании поры предполагали участие трех обязательных компонентов: (1) адениннуклеотид-транслоказа внутренней мембраны ANT (adenine nucleotide translocase), (2) потенциалзависимый анионный канал наружной мембраны VDAC (voltage-dependent anion channel), (3) пептидилпролил-цис/транс-изомераза матрикса CypD (циклофилин D). Однако в генетических экспериментах с нокаутами этих белков mPTP формировалась в митохондриях, но проявляла меньшую чувствительность к ионам кальция и АФК, что, в целом, свидетельствует о второстепенной роли ANT, VDAC и CypD в структуре mPTP. В связи с чем на роль кандидатов структурных элементов mPTP были предложены другие каналообразующие белки наружной (периферический бензодиазепиновый рецептор, проапоптотические белки Bax/Bak) и внутренней (переносчик фосфатов) мембран митохондрий (Šileikytė J., 2019; Zorova L.D., 2018; Karch J., 2019). На современном этапе обсуждаются две гипотезы структурной организации поры, каждая из которых имеет экспериментальные подтверждения: (1) «гипотеза димера» рассматривает формирование mPTP как результат перехода АТФ-синтазы (Fo/F_1) от АТФ-синтезирующей конформации к АТФ-диссипирующей (АТФаза); (2) «гипотеза с-кольца» («гипотеза одномерной поры») предполагает, что центральным компонентом поры

является с-субъединица АТФ-синтазы, которая проявляет свойства канала в результате АФК- и Ca^{2+} - зависимой диссоциации F1 и F₀ доменов АТФ-синтазы. Гипотеза одномерной поры в качестве обязательных структурных элементов mPTP рассматривает субъединицу с АТФ-синтазы и CypD, поскольку генетическая блокада остальных компонентов поры не устраняет феномен формирования mPTP в митохондриях (Šileikytė J., 2019, Zorova L.D., 2018, Karch J., 2019).

Управление проницаемостью mPTP является главной целью фармакологических воздействий, поскольку поддержание митохондриального потенциала ограничивает деление, митофагию и апоптотическую гибель клеток. Современные разработки в коррекции высокой проницаемости mPTP основаны на ингибировании активности ключевых структурных компонентов поры ANT, VDAC, CypD, АТФ-синтаза. Наиболее заметные эффекты десинсибилизации поры оказывают иммуносупрессоры санглиферин А (sanglifehrin A), циклоспорин А (CsA) и его неиммунноактивные аналоги (N-Me-Ala-6-cyclosporine A, N-Me-Val-4-cyclosporine A, NIM811, Debio-0125), которые взаимодействуют с CypD, ингибируют его пептидилпролил-цис/транс-изомеразную активность, предотвращают его связывание с ANT и другими компонентами mPTP. Однако при системном введении они характеризуются низкой растворимостью и биодоступностью, требуют введения высоких концентраций, проявляют нейро-, нефро-, гепатотоксичность. Основной прием усиления действия ингибиторов mPTP состоит в их целевой митохондрио-адресованной доставке с применением: (1) инкапсулирования препарата в биоабсорбируемые полилактатные-гликолевые наночастицы; (2) конъюгации с положительно-заряженными митохондриальнотропными пептидами или липофильными катионами, поступающими в митохондрии потенциалзависимо (Naryzhnaya N.V., 2019).

Поскольку действие прямых ингибиторов mPTP реализуется в результате преодоления препаратами цитоплазматической и митохондриальных мембран, альтернативный подход в ограничении проницаемости mPTP связан с применением агонистов клеточных рецепторов, инициирующих нейропротекторные сигнальные каскады на поверхности клетки. Эффективными непрямыми ингибиторами mPTP являются агонисты D₂-рецептора дофамина (прамипексол, pramipexol), которые предотвращали открытие mPTP в модели окклюзии средней мозговой артерии у крыс по механизму модуляции киназ (PI3K/AKT/GSK3 β), ингибирования транслокации Bax в наружную мембрану митохондрий (Andrabi S.S., 2019).

В качестве эффективных не прямых блокаторов mPTP могут быть использованы ингибиторы гликогенсинтазы-киназы-3 β (GSK-3 β), которая имеет решающее значение для митохондриального гомеостаза, участвует в патогенезе сердечных и церебральных заболеваний. Транслокация GSK-3 β из цитозоля в митохондрии способствует открытию mPTP. Ингибирование GSK-3 β (SB216763, гинкголид К, галловая кислота) подавляет открытие пор за счет снижения взаимодействия ANT и CypD. Активаторы AMPK (A-769662, метформин) ингибировали GSK-3 β , снижали производство АФК и открытие mPTP (Naryzhnaya N.V., 2019).

Высокий потенциал в ограничении проницаемости mPTP имеют антиоксиданты поскольку именно АФК, а не ионы кальция, являются более важными триггерами открытия mPTP в возбудимых клетках, таких как нейроны и кардиомиоциты (Naryzhnaya N.V., 2019). Есть сообщения о выраженных протективных эффектах и ингибировании открытия mPTP при использовании митохондриально-направленных антиоксидантов. Были разработаны митохондриально-адресованные полифенолы, что повышало их селективное накопление и эффективность в митохондриях. Флавоноиды наиболее распространенные биологически активные полифенолы. Некоторые

флавоноиды проникают через ГЭБ (кверцетин, гесперидин, куркумин, ресвератрол) и обладают наиболее мощной антиапоптотической активностью. Полифенолы предотвращают открытие mPTP в результате непосредственного взаимодействия с компонентами поры. СурD инактивируется деацетилазой SIRT3, активация которой осуществляется флавоноидами. Куркумин взаимодействует с VDAC1. Ресвератрол способствует деацетилированию VDAC1 через Sirt1, ингибирует взаимодействие с Вах, предотвращает открытие mPTP и апоптоз (Naoi M. et al., 2019).

1.5.7 Активация слияния митохондрий

Митохондрии представляют собой высокодинамичные органеллы, сложная архитектурная организация которых формируется в результате процессов слияния, деления и транспорта внутри клетки. Зрелые нейроны с развитыми синаптическими связями отличаются более длинными и стационарными митохондриями, тогда как незрелые нейроны имеют мелкие и подвижные митохондрии (Farshbaf J.M., Kiani-Esfahani A., 2018). Известно, что слабый непродолжительный стресс инициирует слияние митохондрий, поддержание митохондриального потенциала и продукции АТФ. Слияние способствует оптимальному функционированию митохондрий за счет «разбавления» поврежденной мтДНК и «спасения» дефектных митохондрий путем приобретения ключевых компонентов из здоровых органелл (Farshbaf J.M., Kiani-Esfahani A., 2018; Uittenbogaard M., 2014). Условия длительного тяжелого стресса провоцируют фрагментацию (деление) и деполяризацию митохондрий. Было показано, что митохондрии подвергаются массивной фрагментации в течение 20 минут ишемии (Yang J.L., 2018; Anzell A.R. et al., 2018).

Динамику митохондрий (слияние и деление) контролируют белки, принадлежащие семейству динаминов - гомологичных белков, проявляющие активность ГТФаз. Таким образом, как слияние, так и деление митохондрий

являются энергозависимыми процессами. Деление митохондрий регулирует динамин-связанный белок 1 (dynamin-related protein 1, Drp1). Drp1 находится в цитозоле. После фосфорилирования киназами (PKC, CaMK, PKA) и активации Drp1 связывается митохондриальным фактором деления (mitochondrial fission factor, MFF) наружной мембраны митохондрий и запускает деление. Слияние митохондрий опосредуют белки митофузины (mitofusin 1, Mfn1; mitofusin 2, Mfn2), встроенные в наружную мембрану митохондрий и обеспечивающие ее слияние, а также белок зрительной атрофии (optic atrophy 1, OPA1), включенный во внутреннюю мембрану и опосредующий ее слияние. Мутации этих белков вызывают тяжелые неврологические нарушения, такие как периферическая нейропатия Шарко-Мари-Тута и аутосомно-доминантная атрофия зрительного нерва, соответственно (Yang J.L., 2018; Uittenbogaard M., 2014; Anzell A.R. et al., 2018).

Помимо участия в контроле динамики митохондрий Mfn2 активирует образование контактов митохондрий с мембранами ЭПР и, таким образом, участвует в механизмах ЭПР-митохондриальной секвестрации ионов кальция, а также способствует аксональному транспорту митохондрий, что тесно связывает Mfn2 с механизмами нейропротекции и нейрорепарации (Chang C-Y. et al, 2019).

Долгое время считалось, что деление митохондрий является необходимым механизмом в осуществлении репаративных и регенеративных процессов в поврежденных нейронах, поскольку облегчает подвижность и доставку митохондрий к участку повреждения. Кроме того, мелкие митохондрии с дефектами энергопродуцирующей системы и низким мембранным потенциалом доступны для регулируемой быстрой элиминации из митохондриального аппарата с помощью митофагии. Тем не менее, новые данные, полученные на моделях ишемии, гипоксии, кислород-глюкозной депривации, показывают, что тяжелая гипоксия/ишемия влечет

деполяризацию митохондрий, сопряженную PINK1/parkin-опосредованную убиквитинацию и деградацию Mfn1/2, расщепление OPA1 стресс-активируемыми пептидазами (YME1L, OMA1), что провоцирует активацию деления митохондрий. Подавление слияния сопровождается нарушением распределения и кластеризацией нуклеоидов (комплексы мтДНК с белками), нарушению репликации и транскрипции мтДНК, что блокирует процесс биогенеза митохондрий, препятствует обновлению и поддержанию функциональности митохондриальной массы в поврежденных клетках. Более того, на участках деления митохондрий происходит выход проапоптотических белков, запускающих каскад реакций «внутреннего» митохондриозависимого пути апоптоза (Ramos S.E, 2019).

Таким образом, стимуляция слияния митохондрий после воздействия ишемии является важнейшей нейропротекторной стратегией, которая, с одной стороны, обеспечивает поддержание репликации/транскрипции мтДНК, митохондриогенеза, биоэнергетических характеристик (высокий митохондриальный потенциал, продукция АТФ, секвестрация ионов кальция), с другой – блокирование апоптотических механизмов (Uittenbogaard M, 2014; Ramos S.E, 2019).

Фармакологические препараты, которые ингибируют деление митохондрий, либо способствуют слиянию защищают нейроны от ишемического повреждения. Drp1 siRNA и малые молекулы-ингибиторы Drp1 предотвращали деление митохондрий, потерю мембранного потенциала и гибель клеток при глутаматной эксайтотоксичности или кислород-глюкозной депривации (КГД) *in vitro* и после ишемического повреждения головного мозга *in vivo*. Гинкголид К – природное соединение, обнаруженное в листьях гинкго билоба – ослаблял апоптоз нейронов в модели КГД путем ингибирования рекрутинга Drp1. P110 – новый селективный ингибитор Drp1 - снижал объем инфаркта у крыс при ишемически-реперфузионном повреждении. Динасор (dynasore) и Midivi 1 (ингибитор митохондриального

деления, mitochondrial division inhibitor, Mdivi 1) – селективные ингибиторы Drp1, защищали мозг в модели окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) (Russo E. et al, 2018).

Учитывая, что активность Drp1 и деление митохондрий необходимы для синаптогенеза, а ингибирование и делеции Drp1 приводят к дефектам синаптической передачи, нарушениям обучения и памяти, наибольшее значение в регуляции митохондриальной динамики при ишемии может иметь активация слияния по механизму индукции/активации PGC-1 α (эти подходы рассмотрены в предыдущем разделе), поскольку известно, что PGC-1 α служит коактиватором фактора транскрипции ERRa, контролирующего ген Mfn2 (Flippe K.H., Strack S., 2017). Действительно, недавно было показано, что растительные биофлавоноиды ресвератрол и куркумин (активаторы PGC-1 α) вызывают слияние митохондрий и формирование крупных и разветвленных митохондриальных сетей (Santos T.W. et al, 2018).

1.5.8 Модуляция митофагии

Аутофагия – регулируемый процесс деградации клеточных органелл и макромолекул, осуществляющий: (1) элиминацию дисфункциональных белков и органелл; (2) деструкцию нормально функционирующих органелл в условиях недостатка питательных веществ (голодание); (3) утилизацию органелл в ходе структурно-функциональной трансформации/дифференцировки клетки (Coculescu B.I. et al, 2018).

Из трех известных видов аутофагии – макроаутофагия, микроаутофагия, шаперон-опосредованная аутофагия – термин «аутофагия» наиболее часто используется применительно к макроаутофагии (типичная аутофагия), при которой клеточные органеллы и белки, «помеченные» для уничтожения, окружаются двойной мембраной (сходной с цистерной ЭПР) и формируют аутофагосому. Аутофагосома сливается с лизосомой, образует аутолизосому, содержимое которой расщепляется кислыми лизосомальными

гидролазами. При микроаутофагии цитоплазматические частицы окружаются лизосомой (без промежуточной везикулы). Опосредованная шапероном аутофагия нацелена на дисфункциональные белки, реализуется при участии цитозольного шаперона HSC-70 (heat shock cognate 70 kDa). Белок-шапероновый комплекс взаимодействует со специфическим лизосомальным мембранным рецептором LAMP-2A (lysosomal-associated membrane protein 2A), транспортируется в лизосому и деградирует (Nikolietopoulou, V. Et al., 2013; Coculescu B.I. et al, 2018).

В реализации всех стадий аутофагии (инициация, формирование аутофагосомы, слияние с лизосомой и деградация) задействованы специализированные белки, связанные с аутофагией (autophagy-related proteins, Apg). Наиболее изученными белками в этой группе являются беклин-1 (beklin-1; Apg6; участвует в инициации аутофагии), LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; белок легкой цепи 3, ассоциированный с микротрубочками; вовлечен в формирование аутофагосом), p62 (белок-адаптер, селективно связывает и поставляет в аутофагосому убиквитинированные белки-мишени, подлежащие деградации). Активность беклина-1 подавляется антиапоптотическими белками bcl-2 и bcl-xl, что приводит к блокаде аутофагии. Другие члены семейства Bcl-2 (Noxa, BH3-only белки) могут вытеснять bcl-2 из комплекса с беклином-1 и способствовать аутофагической гибели клеток (Coculescu B.I. et al., 2018; Sun Y. et al., 2019). Фосфорилирование беклина-1 и торможение аутофагии осуществляется серин/треониновой протеинкиназой mTOR (mammalian target of rapamycin), которая служит главным сенсором уровня питательных веществ и энергетического статуса клетки. При снижении уровня субстратов и увеличении соотношения АМФ/АТФ происходит активация АМФ-зависимой киназы (АМРК), фосфорилирование и дезактивация mTOR, что, в целом, сопровождается инициацией аутофагии. АМРК также фосфорилирует/активирует фактор деления митохондрий (mitochondrial

fission factor, MFF), связывающий белок Drp1 в митохондриях, опосредующий их фрагментацию и последующую митофагию (Coculescu B.I. *et al.*, 2018; Sun Y. *et al.*, 2019).

Основными мишенями фармакологических воздействий, направленных на регуляцию аутофагии, являются беклин-1 и mTOR. Активаторы беклина-1 были использованы для лечения инсультов и инфарктов, ингибиторы mTOR (рапамицин и его аналоги CCI-779, RAD001, AP23573) - при нейродегенеративных заболеваниях, связанных с нарушениями механизмов аутофагии, активацией апоптоза и некроза (Sun Y., 2019). Процесс деградации митохондрий по механизму макроаутофагии был назван митофагией в 2005 г. Митофагия элиминирует поврежденные митохондрии, контролирует качество и количество митохондрий, устраняя дисфункциональные или избыточные митохондрии, которые могут генерировать АФК и вызывать гибель клеток (Coculescu B.I. *et al.*, 2018). В нейронах в физиологических условиях полное обновление митохондриальной массы (митохондриальный оборот) осуществляется за 2-4 недели. Митофагия происходит вosome, где локализованы зрелые лизосомы, и связана с ретроградным движением митохондрий (Uittenbogaard M., 2014).

Устранение дисфункциональных митохондрий имеет решающее значение для выживания клеток при гиперпродукции АФК и активации апоптоза. Митофагия происходит без выделения апоптотических факторов и часто рассматривается в исследованиях инсульта как механизм выживания клеток, предотвращающий апоптоз нейронов (Guan R. *et al.*, 2018).

При ишемии мозга осуществляется процесс селективной митофагии деполяризованных митохондрий (путь PINK1/parkin; паркин-зависимый) и паркин-независимый Bnip3/Nix путь, реализуемый для митохондрий со стабильным мембранным потенциалом, опосредуемый активацией HIF-1 α при ишемии/гипоксии. PINK1, parkin, Bnip3, Nix определяют как рецепторы

митофагии в клетках млекопитающих (Yang J.L. *et al*, 2018; Anzell A.R. *et al.*, 2018).

PINK1 и паркин имеют определяющее значение в реализации митофагии в нервной системе, а их мутации и дисфункции связаны с семейными формами болезни Паркинсона (Guan R. *et al*, 2018). PINK1 (phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase protein 1; протеинкиназа 1, индуцируемая фосфатазой и гомологом тензина) является серин/треониновой протеинкиназой, которая содержит N-терминальную митохондриотропную последовательность. В здоровых клетках PINK1 импортируется в митохондрии и расщепляется протеазой PARL (presenilins-associated rhomboid-like protein) внутренней мембраны митохондрий. В условиях деполяризации митохондрий PINK1 активируется фосфорилированием, стабилизируется, связывается с поверхностью митохондрий, что приводит к фосфорилированию и рекрутингу паркина на наружной мембране митохондрий. Паркин – убиквитинлигаза E3 – полиубиквитинирует белки наружной мембраны митохондрий, вызывает их связывание с убиквитин-специфичными доменами рецепторов аутофагии (p62 – убиквитин-связывающий адаптер; соединяет убиквитинированные белки, LC3 и мембрану ЭПР для формирования аутофагосомы). Митохондрии, изолированные с помощью мембран ЭПР, сливаются с лизосомами и деградируют. Транслокация паркина в деполяризованные митохондрии ингибируется белками выживания (Bcl-xl, Mcl-1) и провоцируется BH3-only белками (Bad, Bim, Noxa) (Guan R. *et al.*, 2018).

Bnip3 (Bcl-2/E1B-19 kD – interacting protein 3) является проапоптотическим белком и мишенью HIF-1 α . На ранней стадии острого инсульта двойной нокаут HIF-1 α /HIF-2 α у мышей предотвращал раннюю Bnip3-опосредованную гибель нейронов и неврологические нарушения. Bnip3 и Nix (Bnip3-like, Bnip3L), гомологичные белки семейства bcl-2, локализуются на наружной мембране митохондрий, контролируют

включение (секвестрацию) поляризованных митохондрий в аутофагосомы. Bnip3 и Nix участвуют в митофагии, вызванной ишемией-реперфузией головного мозга. Bnip3 и Nix связывают Bcl-2, вызывают диссоциацию Bcl-2-беклин-1-комплекса, высвобождают беклин-1 для инициации аутофагии и митофагии. При паркин-независимой митофагии, в условиях голодания или гипоксии, экспрессия NIX и Bnip3 активирована, белки экспонированы на цитозольную поверхность митохондрий и взаимодействуют с белками аутофагии – Atg8 и LC3 (Guan R. *et al.*, 2018). Bnip3 участвует в гибели нейронов в моделях ишемии мозга и кислород-глюкозной депривации корковых нейронов, что связано с Bnip3-опосредованной чрезмерной митофагией. Гиперактивация митофагии в сочетании с угнетением биогенеза митохондрий и снижением биосинтеза белка при ишемии, приводит к снижению митохондриальной массы, дефициту производства АТФ, инициации программ апоптоза и некроза (Anzell A.R. *et al.*, 2018).

Исследования патогенетических механизмов инсульта свидетельствуют о повреждающей роли чрезмерной индукции митофагии после церебральной ишемии. Хотя физиологические или умеренные уровни митофагии способствуют выживанию нейронов, генерализованная активация PINK1/паркин и Bnip3/Nix путей митофагии может усугубить ишемическое повреждение головного мозга (Anzell A.R. *et al.*, 2018).

Ингибирование паркин-зависимой митофагии, триггером которой является гиперпродукция АФК, может осуществляться с помощью антиоксидантов, в особенности, митохондриально-адресованных антиоксидантов. Митохондриотропный ресвератрол, связанный с липофильным катионом трифенилфосфония (ТФФ), поглощается митохондриями при потенциале 30-60 мВ в 5-10 раз интенсивнее, чем свободный ресвератрол, а при потенциале 150-180 мВ – в 100-500 раз (Naoi M., 2019). ТФФ-конъюгаты ресвератрола и кверцетина улучшают митохондриальную функцию в моделях церебральной ишемии (Flirpo K.H.,

Strack S., 2017). Также сообщалось, что ингибирование митофагии карнозином после ОСМА у крыс реализовывалось за счет снижения рекрутинга паркин в митохондрии (Guan R. et al, 2018).

Подавление паркин-независимой митофагии может осуществляться с помощью широко применяемого ингибитора HIF-1 α 2-ME2 (2-methoxyestradiol; метаболит эстрадиола). 2-ME2 вызывает значительное снижение экспрессии беклина-1 и LC3-II, подавление аутофагии и оказывает выраженные защитные эффекты при ишемии/реперфузии. В качестве эффективных ингибиторов HIF-1 α применяют дигоксин, акрифлафин, доксорубицин (Yang J.L. et al, 2018; Russo M.A. et al., 2019).

Подавление митофагии может быть реализовано с помощью индукции антиапоптотических белков (bcl-2, bcl-xl), которые инактивируют беклин-1 и механизмы аутофагии. Известно, что растительные полифенолы проявляют нейротрофин-подобную активность в мозге путем вмешательства в механизмы транскрипции, либо путем активации рецепторов нейротрофинов [Naoi M. et al., 2019].

Флавоноиды (кверцетин, катехин, генистеин) и другие природные полифенолы (куркумин, ресвератрол) наиболее заметно активируют mTOR-регулируемую экспрессию генов и посттранскрипционную модификацию факторов, связанных с митофагией, стимулируют митохондриогенез, динамику митохондрий и, предположительно, могут быть наиболее перспективными нейропротективными фитохимическими агентами [Naoi M. et al., 2019; Guan R. et al, 2018].

Проблема неуклонного роста заболеваемости острыми нарушениями мозгового кровообращения требует, с одной стороны, глубокого и всестороннего исследования причин угрожающей тенденции распространения патологии и, с другой - разработки эффективных мер коррекции ишемического повреждения мозга, тяжелых функциональных

нарушений, предупреждения рецидивирования инсульта и вторичных осложнений.

Исследования патогенетических механизмов ишемического инсульта, выполненные в минувшем десятилетии, показали, что главенствующая роль в развитии повреждения нейронов пенумбры принадлежит митохондриальной дисфункции, а поддержание структурно-функциональной стабильности митохондрий является основой эффективной и надежной нейропротекции.

Стоит отметить, что одним из наиболее перспективных направлений митохондриотропной стратегии противоишемической защиты нейронов следует признать применение митохондриально-адресованных антиоксидантов (mitoQ, SkQR1, ресвератрол-ТФФ и др.), поскольку именно нерегулируемая гиперпродукция АФК является триггером открытия митохондриальной неспецифической поры высокой проницаемости (mPTP) и сопряженной инициации апоптотической клеточной гибели.

Пристального внимания заслуживают плеiotропные регуляторы митохондриального гомеостаза, которые активируют транскрипционный коактиватор PGC-1 α , причастный к биогенезу митохондрий, митохондриальному слиянию, поддержанию антиоксидантной системы митохондрий и нейронов.

Поскольку область ишемии и пенумбры является, в силу резкого ограничения кровотока, условно доступной для поставки нейропротекторных агентов представляется оправданным производить фармакологическую стимуляцию репаративных и регенеративных функций в сопряженных с областью поражения нейронах и глиальных клетках.

Таким образом, с учетом имеющихся на сегодняшний день данных о возможных методах коррекции нейродегенеративных нарушений, а также клинических неудачах, наиболее оправданным и приоритетным подходом может быть тактика нейропротекции препаратами с мультитаргетным

механизмом действия, модулирующих нейромедиаторный профиль, окислительно-восстановительный баланс, митохондрио- и ангиогенез, а также репаративную поляризацию микроглии.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Эксперименты на животных

2.1.1 Фотохимический тромбоз сосудов головного мозга крысы (экспериментальный инсульт)

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). Операцию проводили под наркозом, вызываемым внутрибрюшинным введением хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Перед операцией наркотизированным животным вводили внутривенно в яремную вену (*v. jugularis*) вводили 3% раствор фоточувствительного красителя бенгальского розового (Rose Bengal, Sigma-Aldrich St Louis, USA) 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 ($\lambda = 560$ нм) мощностью 250 W (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. Для предупреждения термокоагуляционного эффекта галогеновую лампу охлаждали с помощью вмонтированного в установку вентилятора.

Контрольные измерения температуры животного проводились rectum, температура тела животного колебалась от 36,8С° до 37,6С°. Постоперационная 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.

2.1.2 Поведенческие тесты

2.1.2.1 Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)

Для выработки УРПИ применялась прямоугольная камера размером 45х23х25 см с акриловыми непрозрачными стенками и электрифицированным металлическим полом. Камера разделена стенкой, имеющей квадратное отверстие 6х6 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 5мин. 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 считают выработанным, если ЛП составляет не менее 300с. Животных с меньшим ЛП исключали из дальнейшего эксперимента (Буреш Я. и др., 1991).

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

Состояние ориентировочно-исследовательской активности животных изучали, помещая крысу на 5 мин. 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. До повреждения коры ориентировочно-исследовательская активность животных разных экспериментальных групп значимо не отличалась.

2.1.2.3 Водный лабиринт Морриса. Водный лабиринт Морриса

«Водный лабиринт Морриса» является универсальным тестом проверки когнитивных функций у подопытных грызунов, особенно он эффективен при оценке нарушений функций памяти и обучения, при исследовании нейродегенеративных заболеваний и тестировании терапевтических препаратов, направленных на улучшение когнитивных функций (Morris R., 1984). Лабиринт представляет собой циркулярный бассейн (диаметром 180 см), заполненный непрозрачной водой, в которую погружена небольшая платформа, не видимая животному. Обучение животного по протоколу начинают через 20 дней после фототромбоза.

Для проведения экспериментов использовали белый пластиковый бассейн диаметром 180 см и высотой 40 см. Бассейн заполняли водой ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) до уровня 25 см от дна бассейна. Вся площадь бассейна была условно разделена на четыре равных сектора - квадранта. В центре одного из секторов помещали цилиндр с платформой диаметром 15 см. Этот сектор бассейна обозначали как "целевой квадрант". Поверхность платформы была погружена на 2 см ниже уровня воды. Вокруг бассейна помещали визуальные ориентиры – цветные плакаты с рисунками. Для регистрации движения животного в бассейне использовали цифровую видеокамеру, которую устанавливали над центром бассейна.

Через 20 суток после операции животных начинали обучать в водном лабиринте Морриса. Ежедневно в течение пяти дней проводили по одному сеансу обучения, состоящему из трех испытаний длительностью 90 с. При

этом животных запускали в бассейн из одной из трех стартовых точек, расположенных в разных квадрантах. После достижения платформы крысу оставляли на ней в течение 20 с. Если в течение всего испытания платформа не была обнаружена, крысу "проводили" до платформы крысу оставляли на ней 20 с. После окончания испытания животных высушивали и помещали в клетку. Через 5 минут испытание повторяли. Для оценки пространственного обучения использовали следующие показатели: длину пути (ДП) - расстояние, которое крыса проплывала от точки старта до платформы; время поиска (ВП) платформы - время, которое требовалось крысе для нахождения платформы и среднюю скорость плавания (ССП) - отношение ДП к ВП.

Через 24 ч после окончания обучения проводили контрольное тестирование. Для этого тестируемых животных помещали на 90 с бассейн, из которого предварительно была извлечена платформа. Стартовая точка находилась в секторе, противоположном целевому квадранту. По результатам теста определяли суммарное время пребывания крысы в каждом из четырех квадрантов и чисто пересечения места, в котором ранее располагалась платформа.

Установка для видеорегистрации движения животного представляет собой видеокамеру, расположенную над бассейном. Камера фиксирует треки животного. Эта информация подается на персональный компьютер и сохраняется, проводится видеорегистрация траектории движения и компьютерный анализ данных.

2.3 Магнитно-резонансная томография

Работа была выполнена в учебно-научном межфакультетском центре магнитной томографии и спектроскопии МГУ. Исследования выполнялись на томографе с индукцией магнитного поля 7 Тесла и градиентной системой 105 мТл/м (BioSpec 70/30, Bruker). Животных наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг веса животных внутривенно) или изофлураном (1,5-2%) и

помещали в устройство позиционирования с системой стереотаксиса и терморегуляции. Был использован стандартный протокол исследования мозга крысы, который включал в себя получение T2-взвешенных изображений. Все импульсные последовательности были предварительно отработаны и оптимизированы на фантомах. Для передачи радиочастотного (РЧ) сигнала использовали линейный трансмиттер с внутренним диаметром 72 мм, для детекции РЧ-сигнала – поверхностную приемную катушку для мозга крысы. В основном использовались следующие импульсные последовательности (ИП): RARE - ИП на основе спинного эха с параметрами: TR = 6000 мс, TE = 63,9 мс, толщина среза 0,5 мм, размер матрицы 256 x 384, разрешение 0,164 x 0,164 мм/пиксел. Общее время сканирования одного животного составляло около 25 мин.

2.4 Морфометрическая оценка объема ишемического повреждения

1 серия исследований

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 на ночь. После фиксации материал переносили на сутки в 70⁰ спирт и резали в дистиллированной воде на вибротоме 1000 (Tecnical Product international inc., USA) с шагом 100 мкм. Каждый второй срез последовательно монтировали на предметных стеклах, покрытых желатином, окрашивали 0,2% водным метиленовым синим. Далее препараты обрабатывали по стандартной гистологической методике: обезвоживали в спирте восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам. Гистологические препараты сканировали на слайдовой приставке сканера V100 PHOTO (Epson, USA). Этот метод позволяет получить файл с изображением среза мозга нежно-голубого цвета, на котором четко виден очаг ишемического повреждения – темноокрашенный по краю и светлый в середине. Иногда некротическая ткань распадалась, в

таком случае очагом поражения считали недостающий участок ткани. Для определения площади ишемического повреждения использовали специализированную компьютерную программу Image J (“Bethesda”, США).

Объем очага повреждения фотоиндуцированным тромбозом определяли по формуле: $V = \Sigma S_n \times d$, где d - толщина пары срезов (200 мкм); S_n – измеренная площадь ишемического очага серийного среза в мм²; Σ - сумма объемов ишемического повреждения на срезах.

Коэффициент эффективности защиты (КЭЗ) рассчитывали по формуле:

$$\text{КЭЗ} = (V_o - V_v) / V_o \times 100\%,$$

где V_o - средний суммарный объем очага поражения у животных с введением физраствора, V_v - средний объем очага поражения у животных с введением вещества.

2 серия исследований

Для морфологической оценки перинфарктной зоны, животных из каждой группы выводили из эксперимента на 1-е, 3-и, 7-е, 21-е сутки после моделирования инсульта методом декапитации. Мозг быстро извлекали, фиксировали в 4% забуференном параформальдегиде 24 ч и подвергали стандартным процедурам обезвоживания, обезжиривания, заливки в парафин. Для оценки площади инфаркта и глубины распространения пенумбры использовали срезы на уровне 4,2 мм от брегмы (Рахinos G., 1998), для которых отмечался максимальный размер поражения. Серийные срезы выполняли толщиной 7 мкм, монтировали на стекла, депарафинизировали, окрашивали гематоксилином-эозином. Срезы мозга фотографировали камерой Canon Power Shot A550 (Canon, Japan), были проанализированы с помощью флуоресцентного микроскопа Micromed 3 LUM (Ningbo Sheng Heng Optics & Electronics Co., Ltd; China). Проводили морфометрическую оценку площади инфаркта и процент занимаемой площади от префронтальной коры, а также протяженности зоны пенумбры. Границу зоны пенумбры выявляли на основании трех критериев: (1) наличие гиперхромных

и пикнотических нейронов наряду с неизмененными; (2) присутствие фагоцитирующих клеток (нейтрофилов и макрофагов), цитотоксическое действие которых может приводить к прогрессированию гибели нейронов; (3) развитие постишемического глиоза. Планиметрические расчеты и морфометрические измерения микрофотографий были обработаны в программе ImageJ software. Данные получали при обсчете шести рандомизированных микрофотографий (изображения соответствовали площади пенумбры 0,1 мм²) в трех срезах у четырех крыс.

2.4 Вестерн – блоттинг

Вестерн – блот – анализ использовался для оценки уровня экспрессии PGC-1 α и PGC-1 α -зависимых белков–маркеров. Животных опытной и контрольной групп подвергали декапитации. Мозг быстро извлекали, промывали в ледяном изотоническом растворе, отделяли образцы префронтальной коры головного мозга (2мм околоочаговой ткани коры и соответствующие области у контрольных крыс), хранили в жидком азоте. Замороженные образцы растирали в жидком азоте. Клетки лизировали в охлажденном буфере (50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM ЭГТА, 1% тритон-X-100, 10% глицерин, 1 mM дитиотреитол, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM AEBSF, 60 мкг/мл апротинин, 10 мкг/мл леупептин, 1 мкг/мл пепстатин А) в течение 30 мин. Надосадочную жидкость (цитоплазматический экстракт) (Baghirova,2015) содержащую искомые белки, отбирали после центрифугирования (30 мин; 14000 g; 40C), смешивали с загрузочным буфером (4 x Laemmli Sample Buffer), инкубировали 5 мин при 950C, хранили при (-800C). Концентрацию белка в пробах определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда. Белки подготовленных проб разделяли в 10% полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроэлюцией, блокировали неспецифическое связывание антител в 5% растворе обезжиренного молока в PBS, содержащем 0.1% Tween-20 в течение 1 ч и инкубировали 14 ч при 4°C в растворе первых

моноклональных антител (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA, 1:500) AT: PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; sc-518025), NRF1 (nuclear respiratory factor 1; sc-101102), TFAM (mitochondrial transcription factor A; sc-166965), NDUFV2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2; sc-515589), SDHA (a flavochrome subunit of succinate dehydrogenase; sc-166909), cyt c1 (cytochrome c1; sc-514435), COX2 (cytochrome c oxidase subunit II; sc-514489), ATP5A (ATP synthase alpha chain ; sc-136178), VEGF (vascular endothelial growth factor; sc-365578), VE-cadherine (vascular endothelial cadherin; sc-52751), SYP (synaptophysin; sc-136271), β -actin (sc-47778), первых поликлональных антител anti-GPR91 (Abcam plc, Cambridge, UK, ab41505). Моноклональные антитела против β -актина использовали в качестве контроля загрузки. После отмывки блоты инкубировали 60 мин в растворе вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (ab6789), IgG-HRP (ab205718), m-IgGk BP-HRP (sc-516102) в разведении 1:5000. 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, San Jose, CA, USA). О содержании искомых белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ) и в % к контролю.

2.5 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

высококчувствительный 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.

2.6 Иммуногистохимический анализ

Иммуноцитохимический метод был использован для определения содержания и внутриклеточной локализации PGC-1 α в парафиновых срезах префронтальной коры головного мозга. Срезы депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в спиртах нисходящей концентрации, производили демаскировку антигена кипячением срезов на водяной бане в 0,01M цитратном буфере pH 6,0 в течение 30 мин. Неспецифическое связывание антител блокировали инкубацией с 4% растворе БСА в PBS, содержащем 0,1% тритон X-100, 0,1% NaN₃ в течение 1 ч при 40C. Далее, срезы инкубировали 14 ч при 4°C с первичными моноклональными антителами против PGC-1 α (1:50; Santa Cruz Biotechnology, США; sc-518025). После инкубации срезы отмывали в PBS, инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с фикоэритрином, в разведении 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, США; m-IgGk BP-PE; sc-51614) в течение 2 ч в темноте при 40C. После отмывки в PBS, срезы высушивали и заключали под покровное стекло в anti-fade fluorescence mounting medium (Abcam, Cambridge, MA, USA; ab104135). Флуоресцентную микроскопию выполняли, используя микроскоп Micromed 3 LUM (Ningbo Sheng Heng Optics & Electronics Co., Ltd; China). Для количественного анализа иммуногистохимических препаратов использовали программу VideoTesT-Morphology 5.2 (LLC «VideoTesT», Russia), определяли интегральную оптическую плотность клеток, общее количество иммунореактивных клеток. На основании оценки интегральной оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 3 класса: клетки с высокой, средней и низкой иммунореактивностью (ИР).

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

Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс (префронтальной коре, гиппокампе) определяли на 1-е и 8-е сутки после фототромбоза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Pearson S.J., 1993] (ионпарная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке Repro Sil-Pur, ODS-3, 4x100 мм, размер частиц 3 мкм (Dr.Maisch GMBH. Масос РМ-80 (BAS. США), скорость элюции подвижной фазы 1,0 мл/мин. при давлении 2 атм. Мобильная фаза: 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1,1 мм октансульфоновой кислоты, 0,1 мм ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 3.0). Измерение проводили на стеклоугольном электроде (+0,85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Подвижную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозные фильтры (диаметр пор 0,2 мкм) при Р = 20-40 мм Нг столба и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом с одновременной обработкой на ультразвуковой бане («Серьга». Россия) в течение 40-50 с. Для определения количества моноаминов в структурах мозга крыс использовали раствор, содержащий в качестве внутреннего стандарта диоксибензиламин (ДОБА), 3,4-дигидроксифенилукусусную кислоту (ДОФУК), дофамин (ДА). 5-гидрокситриптамиин (5-ОТ), 5-оксииндолукусусную кислоту (5-ОИУК) в концентрации 500 пкмоль/мл. 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.

2.8 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.

2.9 Используемые препараты

1. **Антитела к глутамату (ГЛУ-АТ)** путем определения уровня нейромедиаторов в структурах мозга (префронтальная кора, гиппокамп). АТ-ГЛУ получали от кроликов, иммунизированных по стандартной схеме конъюгатом глутамат бычий сывороточный альбумин (БСА), синтезированным модифицированным методом с помощью бифункционального реагента глутаральдегида (ФГБНУ НИИОПП, Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А). Титр ГЛУ-АТ, определяемый методом иммуноферментного анализа (ИФА), составил 1:1000. γ -глобулиновые фракции сывороток иммунизированных и интактных кроликов выделяли методом переосаждения сульфатом аммония, очищали от БСА методом аффинной хроматографии, лиофилизировали и хранили при 4°C (Seguela P. et al., 1984). ГЛУ-АТ вводили интраназально животным в дозе 250 мкг/кг через 1 час после фототромбоза 8-дневным курсом.

2. **Дипептид ГК-2** (гексаметилендиамидбис-N-моносукцинилглутамилизин), 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 внутривенно в дозе 1 мг/кг 7-дневным курсом.

3. Производные эритропоэтина. Эритропоэтин (ЕРО) – гликопротеиновый гормон, регулирующий эритропоэз. Методом генной инженерии 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, MEPO-TR, MEPO-Fc) синтезированы в ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов. С использованием полученных плазмид, несущих гены мутантных ЕРО, и техники Flp/FRT сайт-специфической интеграции трансгенов в геном Flp-In/CHO клеток-реципиентов были созданы CHO линии-продуценты соответствующих мутантных белков. Эритропоэтическая активность полученных гибридных белков оценена в тестах *in vitro*, где производилось исследование способности очищенных мутантных белков инициировать пролиферацию UT-7еро клеток, чувствительных к ЕРО в сравнении со стандартным препаратом ЕРО. Анализ полученных данных показал, что способность взаимодействовать с рецептором и соответственно вызывать пролиферацию UT-7еро клеток, редуцирована в 1000 и более раз у мутанта, содержащего замену R103E в контексте мономера ЕРО. В случае димерных молекул с молекулой Fc, способность вызывать пролиферацию была снижена в 100 раз. Таким образом, созданы мутантные молекулы эритропоэтина в контексте ЕРО-TR и ЕРО-Fc с сильно редуцированной эритропоэтической активностью. Полученные рекомбинантные ЕРО-производные исследовались в качестве перспективных кандидатов, характеризующихся нейропротекторной активностью и пролонгированным действием. Производные ЕРО вводились внутривенно в дозе (50 мкг/кг) и интраназально (25 мкг/кг).

4. **Синтетический аналог АКТГ.** В Институте молекулярной генетики РАН синтетический аналог фрагмента АКТГ - АКТГ₄₋₇ (Семакс), полностью лишенный гормональной активности, но обладающий нейропротекторными свойствами (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2005). (АКТГ₄₋₇ торговое наименование Семакс) использовали в качестве потенциального положительного регулятора PGC-1 α пептидной природы. Соединение имеет историю клинического применения в качестве ноотропного и нейропротекторного (Martynov, 2018; Gusev, 2005), который содержит фрагмент аминокислотной последовательности, (Gallo-Payet., 2016) активирующий меланокортиновые рецепторы (MCRs) нейронов, астроцитов, микроглии, олигодендроцитов (Lisak, 2017). Интраназальное введение 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 РАМН в середине 80-х годов прошлого века. ЭМГП сукцинат применяли в качестве потенциального непептидного активатора PGC-1 α . ЭМГП сукцинат преодолевает ГЭБ, имеет энерготропный механизм действия, опосредуемый сукцинатом, и сигнальный механизм, реализуемый при активации сукцинатного рецептора SUCNR1/GPR91, экспрессируемого нейронами, астроцитами, микроглией (Hamel, 2014; Sapieha, 2008; Кирова, 2020). Внутривенное введение в дозе 20, 40, 100 мг/кг.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Нейрохимические и морфофункциональные нарушения при экспериментальном ишемическом повреждении коры головного мозга.

Анализ действия препаратов с нейропротективной активностью

Для изучения механизмов клеточных и морфофункциональных нарушений при ишемическом поражении головного мозга и разработке эффективной патогенетической терапии чрезвычайно важное значение имеет адекватность и воспроизводимость используемых экспериментальных моделей. В нашем исследовании была применена методика воспроизведения ишемии мозга при помощи фотоиндуцированного тромбоза, которая технически проста и приближена к клиническим формам ишемического инфаркта. Моделирование ишемии головного мозга фотохимическим способом (введение фотосенсибилизирующего красителя с последующим облучением черепа крысы фокусированным пучком света длиной волны 560 нм) позволяет вызвать инфаркт в любом желаемом участке коры (Watson B., 1985; Викторов И.В. и др., 1996; Романова Г.А., 2003). При этом размер, глубина поражения зависят от интенсивности света, продолжительности процесса облучения и от дозы введенного бенгальского розового. Большим преимуществом этой модели перед другими является то, что она неинвазивна, т.е. не требует трепанации черепа, а манипуляции, осуществляемые под наркозом минимальны. Формирующаяся зона ишемии отличается малой вариабельностью, высокой воспроизводимостью, что делает эту модель наиболее удобной для оценки объема ишемического повреждения, ее динамики изучения действия фармакологических препаратов.

Зоной повреждения выбрана префронтальная кора головного мозга крысы, отвечающая за интегративную деятельность (зоны Fr1 и Fr2, в соответствии с атласом Paxinos G., and Watson C., 1997; рис. 3.1). Префронтальная кора является одной из основных структур, участвующих в осуществлении пространственной ориентации и вместе с гиппокампом

играет ключевую роль в процессах обучения и памяти (Kolb В., 1982; Sutherland R., et al., 1982; Романова Г.А., Трофимов С.С., 1986; Романова Г.А. с соавт., 1994; 1998).

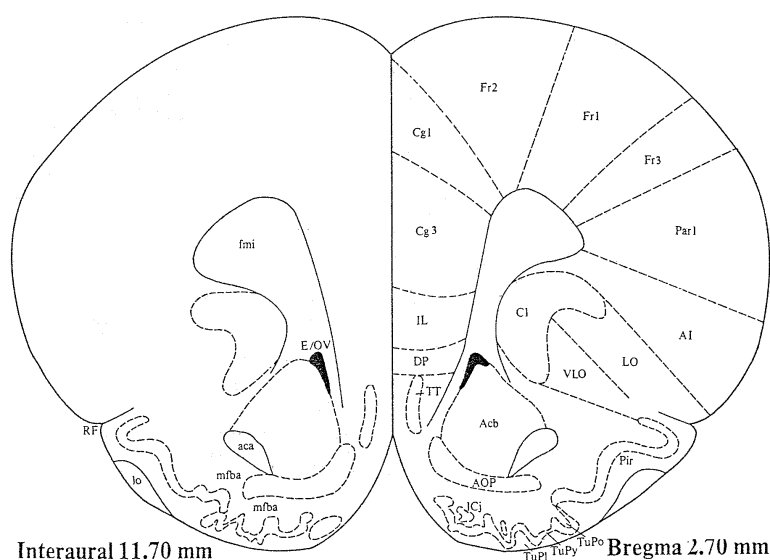


Рисунок. 3.1. Схематическое изображение на срезе головного мозга префронтальной коры (Fr1 и Fr2) - зоны ишемического повреждения (Paxinos G. Watson C., 1997).

В результате исследования было показано, что двустороннее ишемическое повреждение префронтальной коры приводит к стойкому нарушению сохранения следов памяти, выработанного до ишемии, что выражалось в достоверном снижении латентного периода условного рефлекса пассивного избегания (ЛП УРПИ) на 9-е сутки после фототромбоза по сравнению с дооперационным уровнем (ЛП-106,6+26,7 с против 300,0 с; $p < 0,001$, таб.1).

Таблица 1. Изменение ЛП УРПИ (сек) после фототромбоза префронтальной и теменной коры

Фотохимический тромбоз коры				
	Префронтальная		Теменная	
	ЛП УРПИ ложноопер	ЛП УРПИ фототромбоз	ЛП УРПИ ложноопер	ЛП УРПИ фототромбоз
<i>До фототромбоза</i>	300,0	300,0	300,0	300,0
<i>9-ый день после фототромбоза</i>	276,1±8,7	106,6±26,7*#^	282,3±9,1	280,1±8,7

Примечание. * - отличие от дооперационного уровня в той же группе ($P<0,05$); # - отличие от ложнооперированного контроля ($P<0,05$); ^ - отличие от группы с фототромбозом теменной коры ($P<0,05$).

У ложнооперированных животных значимых изменений этого показателя в те же сроки отмечено не было. Для подтверждения избирательности когнитивных нарушений, которые вызваны ишемией префронтальной коры было проведено сравнительное исследование с нарушениями поведения при фототромбозе теменной коры головного мозга крыс. Исследование показало, что фототромбоз не нарушал процесса сохранения воспроизведения УРПИ, выработанного до операции. ЛП УРПИ на 9-ые сутки после ишемического повреждения теменной коры значимо не отличался от дооперационного уровня и составил 280,1±8,7 сек против 300,0 сек ($P<0,01$). Это свидетельствует о том, что повреждение теменной области коры не влияет на сохранение и воспроизведение выработанного до фототромбоза УРПИ.

Исследование двигательной активности животных проводили автоматизированном «открытом поле» РОДЭО-1. До ишемического повреждения коры экспериментальные группы животных по показателям горизонтальной двигательной активности (количество пересечений световых лучей по уровню горизонтального движения) значимо не различались. Во всех экспериментальных группах на 9-е сутки после операции не было существенных изменений массы тела, мышечного тонуса и координации

движений. Снижение горизонтальной двигательной активности (ГА) как в ложнооперированной, так и в ишемизированной группах на 9-ые сутки после фототромбоза префронтальной коры по сравнению с исходными показателями не было статистически значимо (табл. 2). Двустороннее фотохимическое повреждение теменной коры, напротив, сопровождалось выраженным ($65,7 \pm 7,4$ против $202,6 \pm 17,8$; $P < 0,001$) снижением двигательной активности в тесте «открытое поле» (РОДЕО-1) по сравнению с её исходным уровнем у животных достоверно от этого показателя ложнооперированных и в группе с фототромбозом префронтальной коры.

Таблица 2. Изменение горизонтальной двигательной активности (ГА) в автоматизированном открытом поле РОДЕО-1 после фотохимического тромбоза префронтальной и теменной коры головного мозга крыс

Фотохимический тромбоз коры				
	Префронтальная		Теменная	
	ГА ложноопер	ГА фототромбоз	ГА ложноопер	ГА фототромбоз
<i>До фототромбоза</i>	$223,3 \pm 18,4$	$222,1 \pm 11,5$	$208,6 \pm 13,9$	$202,6 \pm 17,8$
<i>9-ый день после фототромбоза</i>	$188,1 \pm 14,2$	$164,1 \pm 18,2$	$172,4 \pm 11,4$	$65,7 \pm 7,4^{* \# \wedge}$

Примечание. ГА-количество пересечений световых лучей по уровню горизонтального движения в РОДЕО-1. * - отличие от дооперационного уровня в той же группе ($P < 0,001$); # - отличие от ложнооперированного контроля ($P < 0,05$); ^ - отличие от группы с фототромбозом префронтальной коры.

Следовательно, исходя из результатов можно заключить, что двустороннее очаговое фотохимическое повреждение префронтальной коры крыс можно рассматривать как экспериментальную модель, позволяющую исследовать механизмы избирательного нарушения когнитивных функций мозга.

Целью первой серии экспериментов было изучение влияния действия препаратов с нейропротективной активностью, относящихся к разным фармакологическим группам на нейрохимические, морфологические и функциональные нарушения в раннем постишемическом периоде на модели фотохимического тромбоза.

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

В последние годы значительно увеличился фронт исследований, направленных на понимание патогенеза ишемического повреждения мозга и поиск фармакологических средств, вызывающих усиление регенеративных процессов при данной патологии (Ginsberg M., 2008; Mattson M.P., 2000). Эти исследования имеют не только теоретическое патофизиологическое значение, но и необходимы для неврологической практики, так как известно, что тромбоз сосудов головного мозга почти всегда приводит к когнитивным расстройствам: нарушению памяти, обучаемости и анализа ситуации, значительно снижая качество жизни (Скворцова В.И., 2005).

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). Эксайтотоксичность один из основных патологических механизмов, приводящих к повреждению и гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и ишемии головного мозга.

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.

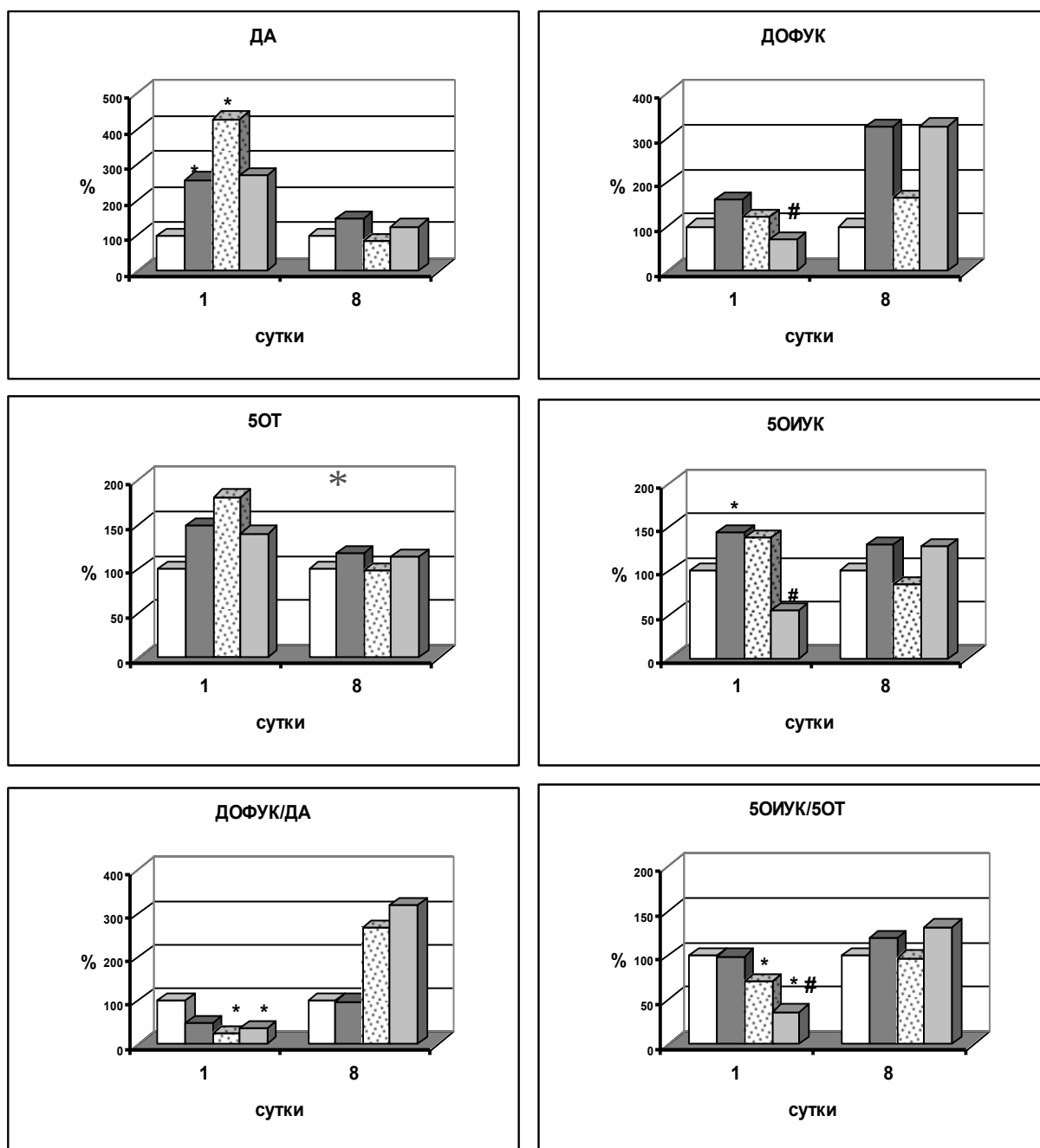


Рисунок 3.2. Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в префронтальной коре после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

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 антител к глутамату (АТ-ГЛУ) ($N = 24$) = 12,66 ($P = 0,0054$) (рис. 3.2). 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 γ -глобулин ($N = 24$) = 12,80 ($P = 0,0051$), а к 8-м суткам оборот дофамина имел тенденцию к увеличению в ишемизированной группе с введением АТ-ГЛУ и с введением γ -глобулина.

Уровень серотонина (5-окситриптамиин, 5-ОТ) в префронтальной коре в первые сутки после ишемии повышался во всех экспериментальных группах. Достоверно повышался уровень 5-оксииндолилуксусная кислота (5-ОИУК) в ишемизированной группе и группе с введением АТ-ГЛУ. В группе с введением гамма-глобулина в этот срок уровень метаболита 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.

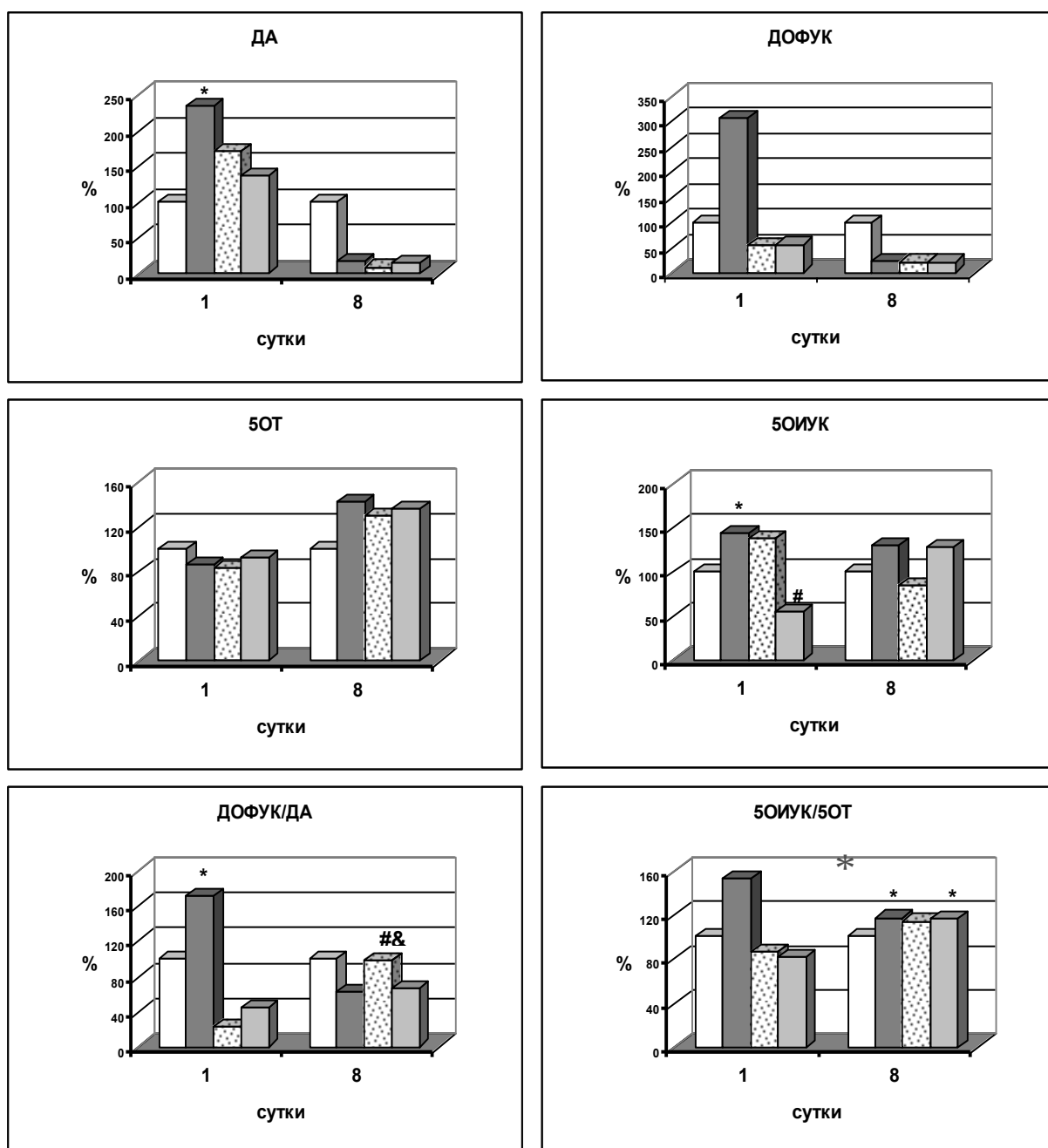


Рисунок 3.3. Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в гиппокампе после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

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 + γ -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 γ -глобулин от интактных кроликов.

Как видно из рис. 3.3 в гиппокампе в первые сутки после фототромбоза ишемизированных животных, получавших NaCl 0,9%, достоверно повышался уровень ДА ($N = 24$) - 12,53 ($p = 0,0057$). Эта тенденция сохранялась в группах с введением АТ-ГУ и γ -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 γ -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 ишемического повреждения коры достоверно выше контроля в ишемизированной группе по отношению к ложнооперированному контролю и достоверно ниже в группе с введением γ -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.

3.1.2 Влияние производных эритропоэтина на нарушение поведение и объем очага при двустороннем ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга

В данном разделе представлены результаты исследования нейропротективных и антиамнестических эффектов карбамилированных форм эритропоэтина (ЕРО) при внутрибрюшинном и интраназальном способах введения на модели фототромбоза сосудов префронтальной коры мозга крыс.

Оценку функционального состояния ЦНС производили по показателям латентного периода условного рефлекса пассивного избегания (ЛП УРПИ) до и после ишемического повреждения коры головного мозга крыс. До фототромбоза у всех обученных экспериментальных животных показатель латентного периода составлял 300 сек. Проверку сохранения выработанного до ишемии условного рефлекса пассивного избегания УРПИ проводили на 4-ые сутки после операции.

В результате исследования показано, что при внутрибрюшинном введении указанных производных эритропоэтина, ЛП УРПИ составлял на 4-ые сутки после ишемии при введении ЕРО-TR - 258 сек, ЕРО-Fc - 227 сек, ЕРО – 243 сек. При интраназальном введении этот показатель составил при введении 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.3.4).

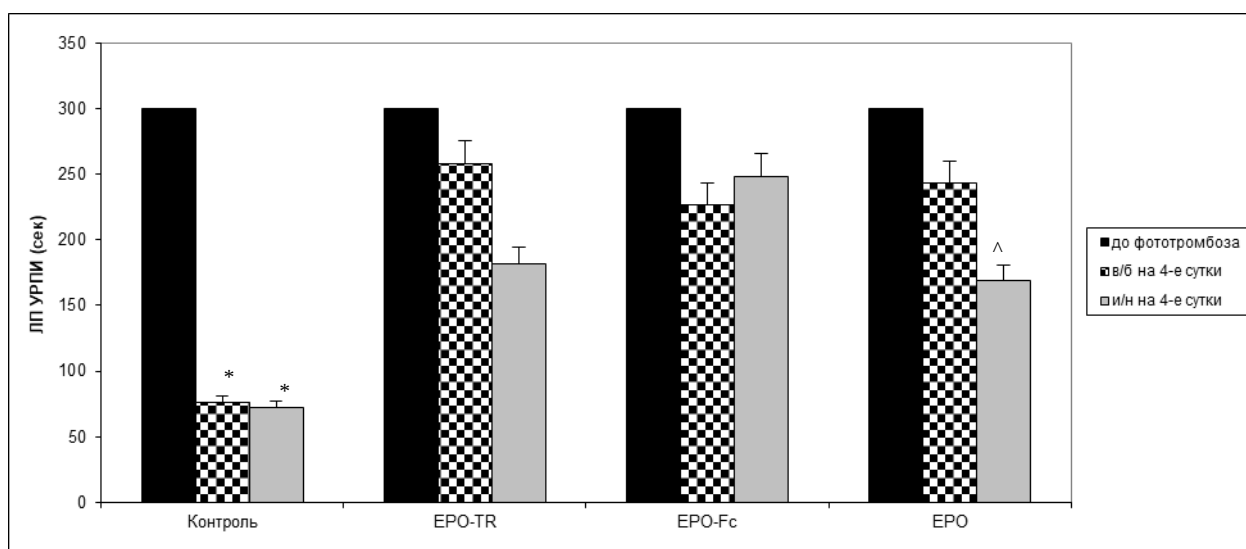


Рисунок. 3.4 Влияние внутрибрюшинного (50 мкг/кг) и интраназального (25 мкг/кг) введения карбамилированных форм белков ЕРО, ЕРО-TR, ЕРО-Fc на сохранение УРПИ у крыс с двухсторонним фототромбозом префронтальной коры. Примечание: * $p < 0,001$ по сравнению с ЛП до фототромбоза; ^ $p < 0,05$ по сравнению 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 (КЭЗ), вычисленный по формуле (см. методику), 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 ($14,3 \pm 2,5$, $P < 0,05$).

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.

Таблица 3. 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 (мм ³) повреждения мозга на крысу при интраназальном введении	28,9±2,2	21,8±1,9	15,0±1,8*	14,3±2,5*
Суммарный объем (мм ³) повреждения мозга на крысу при внутрибрюшинном введении	24,22±4,7	28,8±7,5	15,8±5,4*	23,5±4,0

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

При интраназальном способе введения, самый высокий защитный эффект выявлен у ЕРО-Fc - 47,02%, чуть меньше 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).

Интересно, 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 Fcγ 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.

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

В данном разделе представлены результаты изучения влияния производных эритропоэтина форм на содержание в сыворотке крови белка S100b у крыс с фотохимическим 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. Для определения содержания S-100b белка в образцах сыворотки крови крыс использовали тест-систему “Rat soluble protein-100B (S-100B) ELISA Kit”, согласно инструкции производителя. Анализ представляет собой высокочувствительный ELISA 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 S100b.

Оценка терапевтической эффективности производных эритропоэтина и его мутантных белков проводилась по степени сохранения 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.

Показано, что 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.3.5).

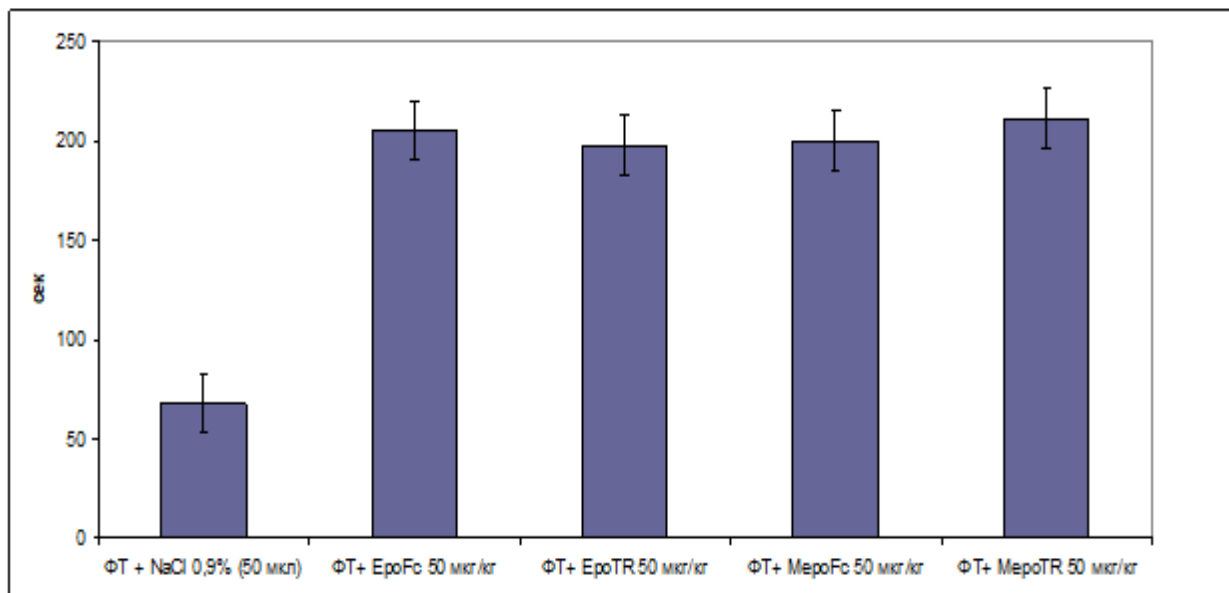


Рисунок. 3.5 Влияние интраназального введения производных эритропоэтина - ЕРО-Fc и ЕРО-TR и их мутантных форм - МЕРО-TR и МЕРО-Fc на сохранение УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры. По оси абсцисс: группы экспериментальных животных - фототромбоз (ФТ) + 50 мкл NaCl 0,9%; ФТ+ЕРО-Fc (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, что подтвердило ранее полученные нами данные (Шакова Ф.М. и др., 2015).

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. 3.6).

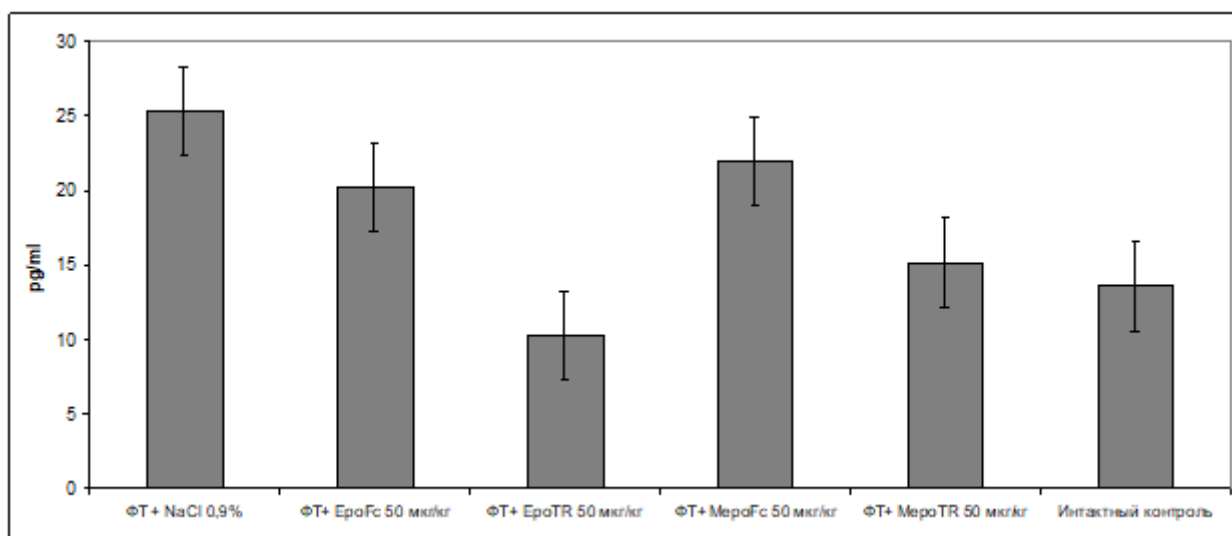


Рисунок 3.6. Влияние интраназального введения производных эритропоэтина - ЕРО-Fc и ЕРО-TR и их мутантных форм - МЕРО-TR и МЕРО-Fc на содержание белка S100b в сыворотке крови крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры. По оси абсцисс: группы экспериментальных животных: Фототромбоз (ФТ) + 50 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%

Показано двукратное повышение уровня белка S100b у крыс с фотохимическим повреждением префронтальной коры по сравнению с интактным контролем. Интраназальное введение ЕРО-TR (50 мкг/кг) достоверно снижало этот показатель. При введении других исследованных производных, отмечена тенденция к снижению уровня S100b, наиболее выраженная у МЕРО-TR.

Таким образом, 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 этих соединений. Исследование уровня белка S100b у тех же животных на 4-е сутки после ишемического повреждения показало нейропротективный эффект ЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг и ($p < 0,05$), а при введении других исследованных производных отмечена тенденция к снижению уровня S100b, которая наиболее выражена у МЕРО-TR.

3.1.4 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-2Н вводили внутрибрюшинно (в/б) в дозе 1 мг/кг через 4 часа после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс в течение 4-х послеоперационных дней.

Все экспериментальные животные были разделены на 5 групп: 1- Фототромбоз + ГК-2Н в дозе 1 мг/кг в/б ($n=10$); 2- фототромбоз + МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг и/н + ГК-2Н в дозе 1 мг/кг в/б ($n=10$); 3 - фототромбоз + МЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг и/н + ГК-2Н в дозе 1 мг/кг в/б ($n=10$); 4- ложнооперированный контроль ($n=10$); 5 - фототромбоз + 0,9% раствор NaCl в объеме 50 мкл ($n=10$). Объем поражения ткани мозга исследовали при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) на 4-е сутки после фототромбоза. Сканирование головного мозга производили 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).

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 внутривбрюшинным 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-2 h составил 300 сек, МЕРО-TR+ГК-2 h - 288 сек, ГК-2 h – 245 сек, у контрольной группы, получавшей 50 мкл NaCl 0,9% этот показатель составил 68 сек. (рис.3.6). 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 комбинированной терапии.

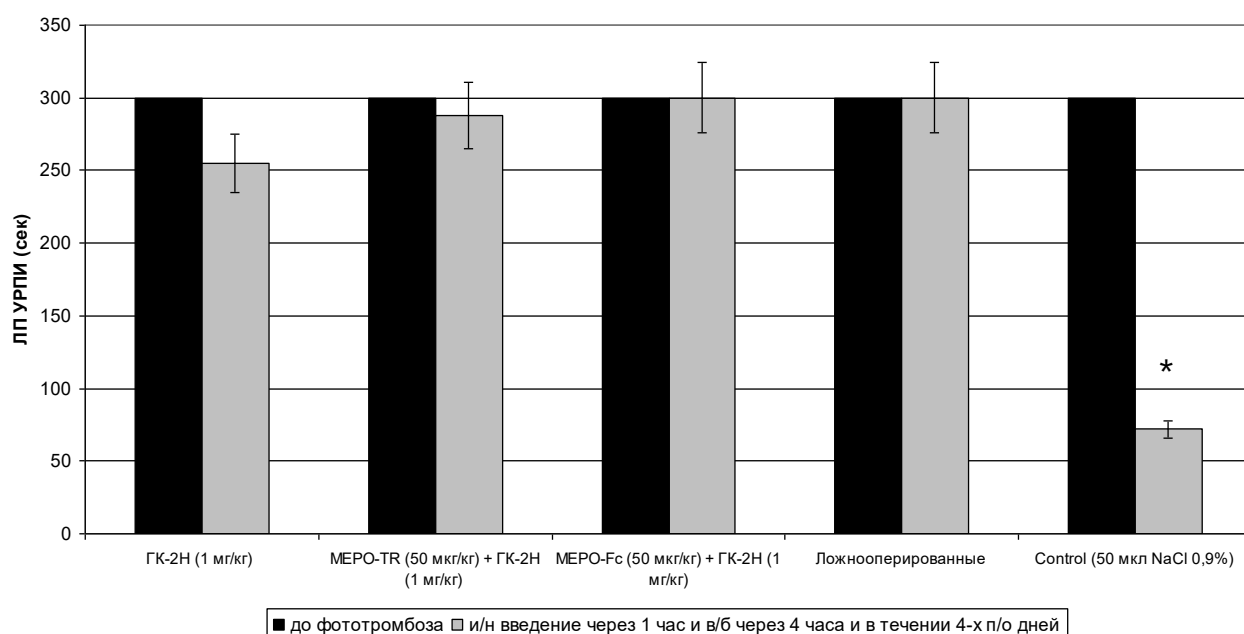


Рисунок 3.7. Влияние комплексной терапии на сохранение УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры.

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.4), что суммарный объем поражения мозга крысы при фототромбозе составил 29,1 мм³. В группе животных, получавших ГК-2h, на 4-е сутки после операции имело место уменьшение объема повреждения на 20% - 23,5 мм³ 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 4. МРТ- исследование суммарного объема очага ишемического повреждения по экспериментальным группам

Группы животных	0.9% раствор NaCl, 0.5 мл	ГК-2h (1 мг/кг)	МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг)	МЕРО-TR (50мкг/кг) + ГК-2h (1 мг/кг)
Суммарный объем (мм ³) 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.2) 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 существенно выше этого показателя у ГК-2h.

Таблица 5. Влияние ГК-2h, МЕРО-Fc, МЕРО-TR и их комбинаций на воспроизведение УРПИ на модели фотохимического ишемического повреждения

Группы животных	МЕРО-TR (50 мкг/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[^]	100[^]

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

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

3.1.5 Формирование пространственной памяти у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга: эффекты синтетического аналога АКТГ₄₋₇

При разработке тактик нейропротекции, последние десятилетия пристальное внимание уделяется нейропептидам, которые вырабатываются

клетками нервной ткани и структурно представляют собой короткие аминокислотные цепочки, обладающие высокой эффективностью и выраженной направленностью действия. Наибольший интерес привлекают нейропептиды, структурно связанные с адренокортикотропным гормоном (АКТГ₄₋₇). Эти соединения способны участвовать в регенерации нервных клеток, а также регулировать процессы поведения, внимания, формирования памяти и обучения.

Целью данного этапа работы было исследовать нарушения пространственной памяти у крыс с двусторонним ишемическим повреждением префронтальной коры мозга и оценить влияние на эти процессы синтетического аналога АКТГ₄₋₇.

Все взятые в эксперимент животные были разделены на три группы: 1- ложнооперированные (ЛО, n=13); 2 – крысы с двусторонним ишемическим инфарктом префронтальной коры головного мозга, которым в первый день- через 15 мин и 1 ч, а далее- через 6 послеоперационных дней вводили интраназально по 7 мкл дистиллированной воды (Иш + Н₂O, n = 23); 3 - животные, которым по той же схеме вводили интраназально водный раствор семакса в дозе 25 мкг/кг Иш + Сем (n = 12).

Показано, что двустороннее повреждение префронтальной коры методом фототромбоза приводит к образованию локального ишемического инфаркта, который захватывает всю толщу коры и отделен от окружающей неповрежденной коры четко обозначенной границей. Влияние ишемии и синтетического аналога АКТГ₄₋₇ на когнитивные функции префронтальной области коры мозга крыс исследовали, используя тест Морриса (рис. 3.8 и 3.9). Этот тест основан на выработке у животных нахождения лабиринте невидимой цели (платформы) по ориентирам (Morris R, 1984).

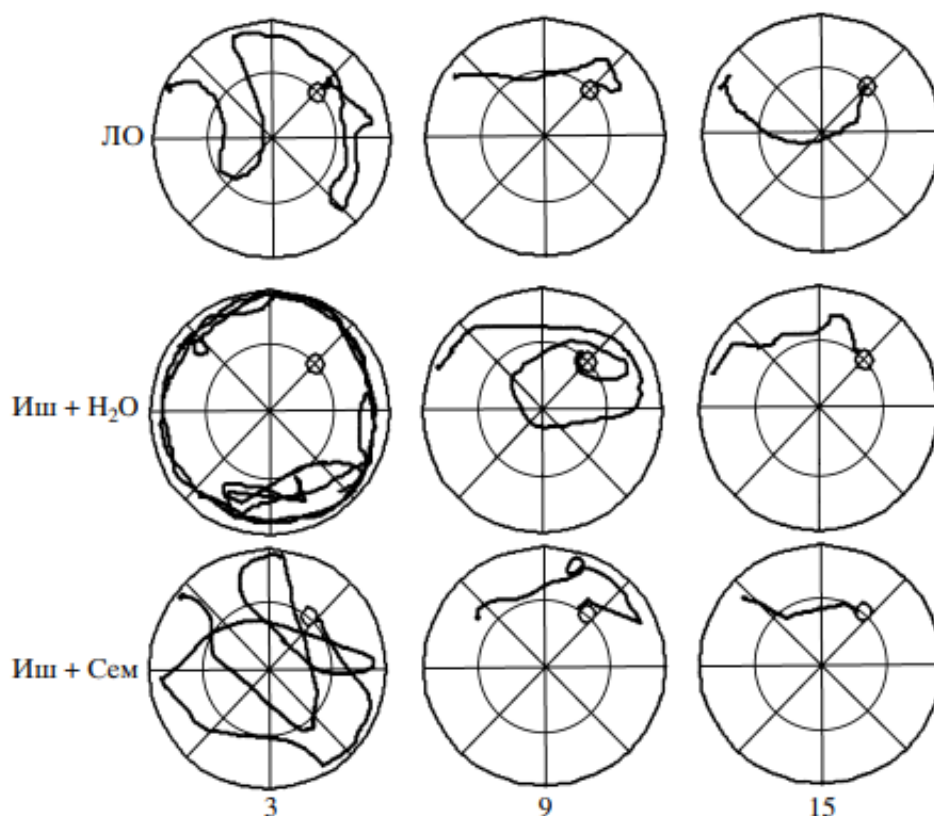


Рисунок 3.8. Примеры треков движения крыс в одном лабиринте на разных сроках обучения. Номера испытаний указаны внизу под рисунками. ЛО - ложнооперированные крысы. Иш – H₂O-контрольные крысы с ишемическим повреждением коры головного мозга, Иш - Сем - крысы с ишемическим повреждением коры мозга и курсовым введением Семакса.

В процессе обучения наблюдали изменение стратегии поиска скрытой платформы (рис. 3.8). 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 АКТГ₄₋₇ (Семакс).

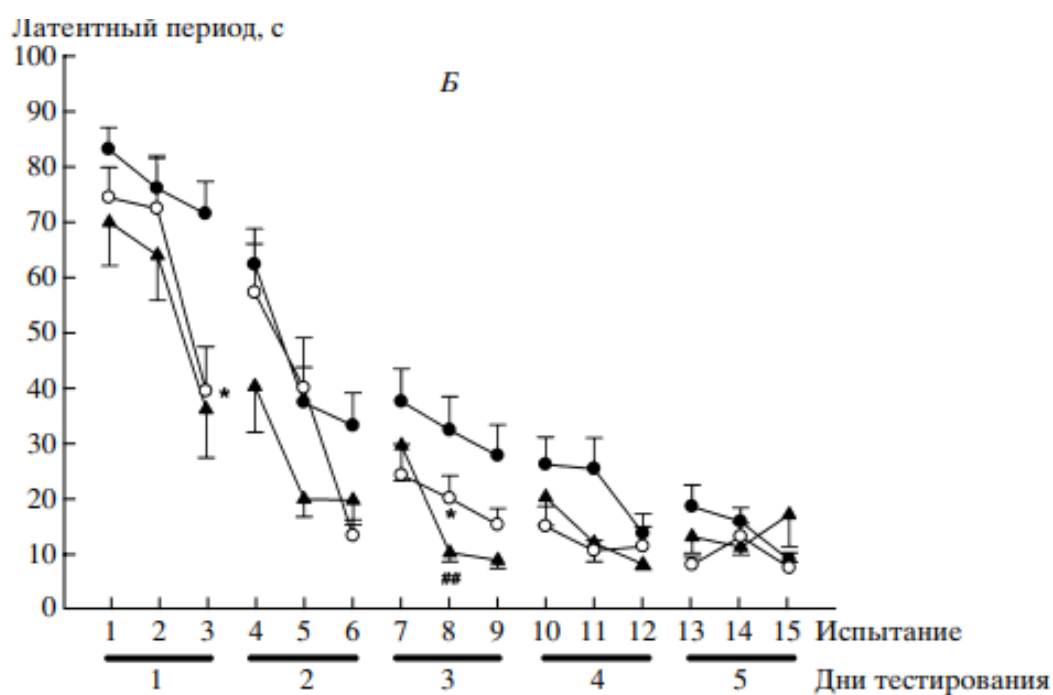
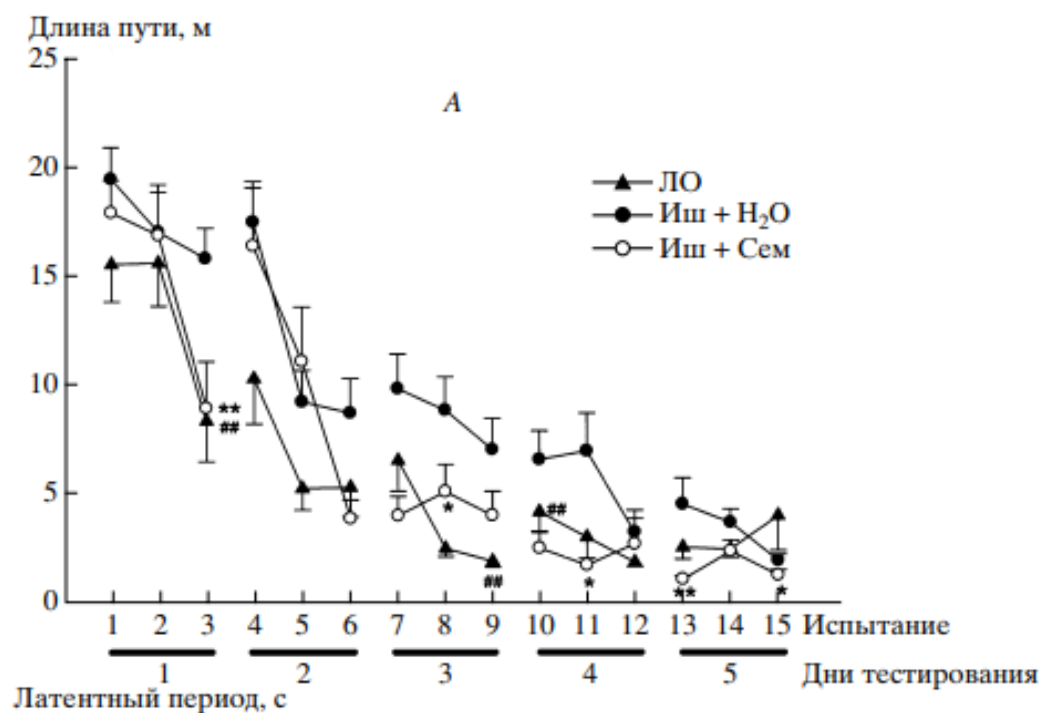


Рисунок 3.9 Изменение средней скорости плавания крыс водном лабиринте через 20-24 сут после операции. Данные представлены в виде среднее + ошибка среднего. - $p < 0.05$, ** - $P < 0.01$ - достоверно значимые различия группы Иш + Сем по сравнению с групп Иш + H₂O.

В первом сеансе обучения подавляющее большинство животных не находило платформу в течение времени, отведенного на тест (рис. 3.9). 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 6. Различия между группами при пространственном обучении крыс в водном лабиринте через 20-24 суток после операции

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

Примечание. Исследование группы животных: ЛО (n=23), Иш + Сем (n=12). ДП – длина пути; ВП – время поиска платформы; ССП -средняя скорость плавания; -^aANOVA с критериями Краскел – Уоллиса; ^bANOVA для выборок с нормальным распределением

Таблица 7. 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#
Иш+ H2O	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 $\pm$ стандартное отклонение. #- $p < 0.05$ по сравнению с Иш + H₂O

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. 6). 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. 6, рис. 3.9 Б). Анализ показал, что группы Иш + Сем и Иш + H₂O статистически значимо различаются по этому показателю в 3-м, 8-м, 11-м, 13-м и 15-м испытаниях (рис. 3.9 А). В то же время наиболее выраженные различия в значениях ВП между группами Иш + H₂O и Иш + Сем наблюдали в первом и втором сеансах обучения (рис. 3.9 Б).

Значения средней скорости плавания (ССП) в группах Иш + H₂O 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. 3.9). 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 рас положения платформы в течение первых 30 с (табл. 7). 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 АКТГ₄₋₇ 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.

3.1.6 Влияние синтетического аналога АКТГ₄₋₇ на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий при двустороннем фотохимическом ишемическом повреждении коры головного мозга крыс

Целью данного этапа исследования была оценка влияния аналога АКТГ₄₋₇ (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.3.7).

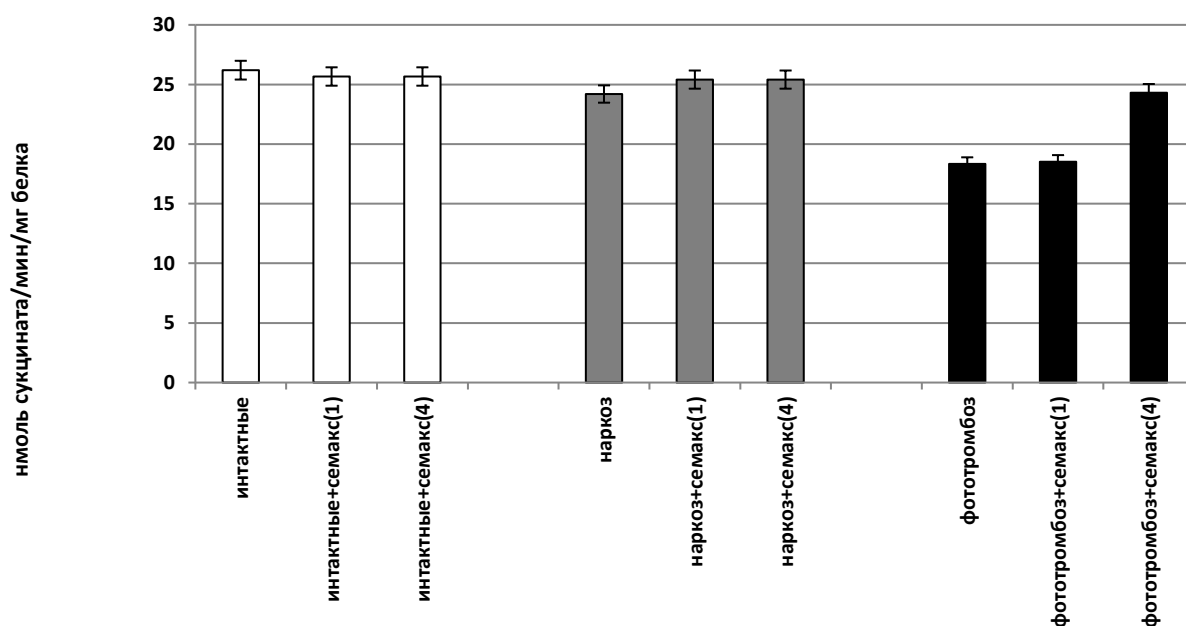


Рисунок 3.10. Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) митохондрий префронтальной коры головного мозга при однократном и четырехкратном введении Семакса. По оси абсцисс отмечены группы животных: 1 – однократное введение Семакса интраназально в дозе 25 мкг/кг, 4 – четырехкратное введение Семакса интраназально 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.

Выявленный на фоне наркоза (через 2 ч после введения 3% хлоралгидрата) краткосрочный эффект снижения активности СДГ, по-видимому, отражает усиление в мозге ГАМК-опосредованных механизмов торможения, антагонистичных СДГ-стимулирующей катехоламиновой сигнализации. Спустя 24 ч после наркоза этот эффект полностью

нивелировался. Наибольшего 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 нами 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).

Таким образом, проведенное исследование позволяет расценивать определение активности СДГ митохондрий перифокальной зоны как перспективный метод оценки тяжести ишемического повреждения мозга и эффективности применяемой нейропротективной терапии. Курсовое введение Семакса в остром периоде ишемического повреждения головного мозга позволило получить устойчивый эффект нормализации активности СДГ в перифокальной зоне префронтальной коры.

3.1.7. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на индукцию церебрального митохондриогенеза

Цель данного этапа исследования - изучение дозозависимого влияния этилметилгидроксипиридина сукцината (Мексидол) на церебральный митохондриогенез. Этилметилгидроксипиридина (ЭМПГ) сукцинат применяли в трех дозах - 20, 40 и 100 мг/кг (дозы 20 и 40 мг/кг находятся в диапазоне рекомендуемых терапевтических доз, применяемых в зависимости от тяжести неврологических нарушений). Эмоксипин (этилметилгидроксипиридина гидрохлорид; ЭМПГ гидрохлорид) применяли

с целью оценить изолированное влияние антиоксидантного компонента Мексидола на церебральный митохондриогенез. Эмоксипин применяли в внутривентриально в дозе 25 мг/кг из расчета, чтобы массовая доля ЭМГП в эмоксипине была идентична его содержанию в 40 мг Мексидола. Внутривентриальные (в/в) инъекции выполняли ежедневно на протяжении 20 дней. Изучение дозозависимого влияния Мексидола и Эмоксипина на индукцию церебрального митохондриогенеза проводили на крысах в возрасте 3-х месяцев. 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 α , 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. Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology, Inc., США) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop. О содержании искомых белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах.

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. 3.11 А-Г).

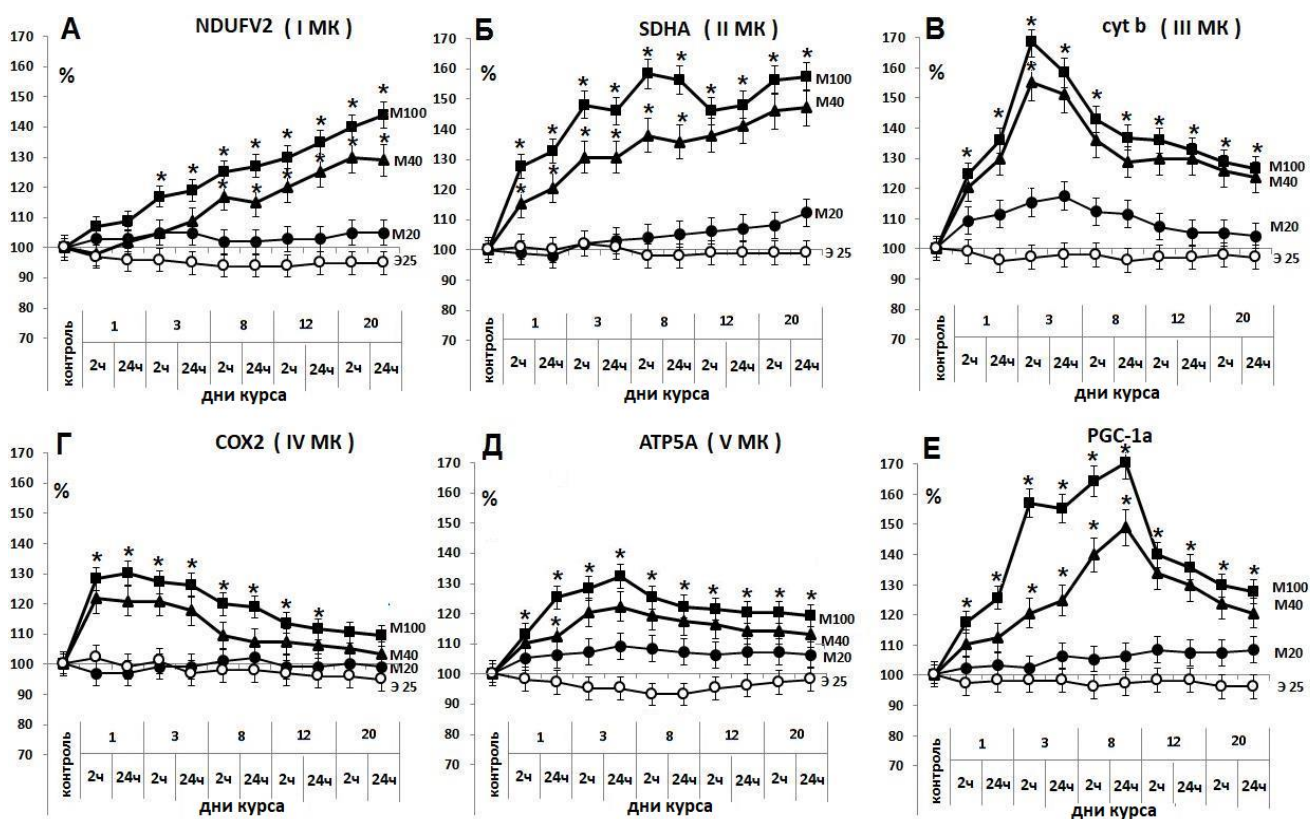


Рис. 3.11. Динамика экспрессии каталитических субъединиц дыхательных ферментов (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX2) и АТФ-синтазы (ATP5A), транскрипционного коактиватора PGC-1 α в коре головного мозга крыс при курсовом применении (внутрибрюшинные инъекции, ежедневно, 20 дней) мексидола в дозах 20, 40, 100 мг/кг 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. 3.11 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. 3.11 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. 3.11 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 (cyt b), синтез которых является сукцинатзависимым, сменяющаяся умеренной репрессией по мере усиления индукции СДГ (SDHA).

Индукция cyt b, имеющая ключевое значение в связи с увеличением экспрессии каталитической субъединицы NDUFV2 I комплекса дыхательных ферментов (рис. 1 А), происходила линейно дозозависимо на протяжении курсов Мексидола (40 и 100 мг/кг), составляя к 20 дню 30% и 40% соответственно.

Модель экспрессии АТР5А отличался от субъединиц субстратного и цитохромного участков дыхательной цепи – содержание АТР5А 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. 3.11 Д).

Индукция каталитических субъединиц митохондриальных ферментов происходила сопряженно с дозозависимым увеличением уровня экспрессии PGC-1 α (рис. 3.11 Е), NRF1, TFAM (рис. 3.12 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 α и транскрипционных факторов NRF1 и TFAM. Эмоксипин также как и в случае с каталитическими субъединицами митохондриальных ферментов не влиял на экспрессию PGC-1 α , NRF1, TFAM.

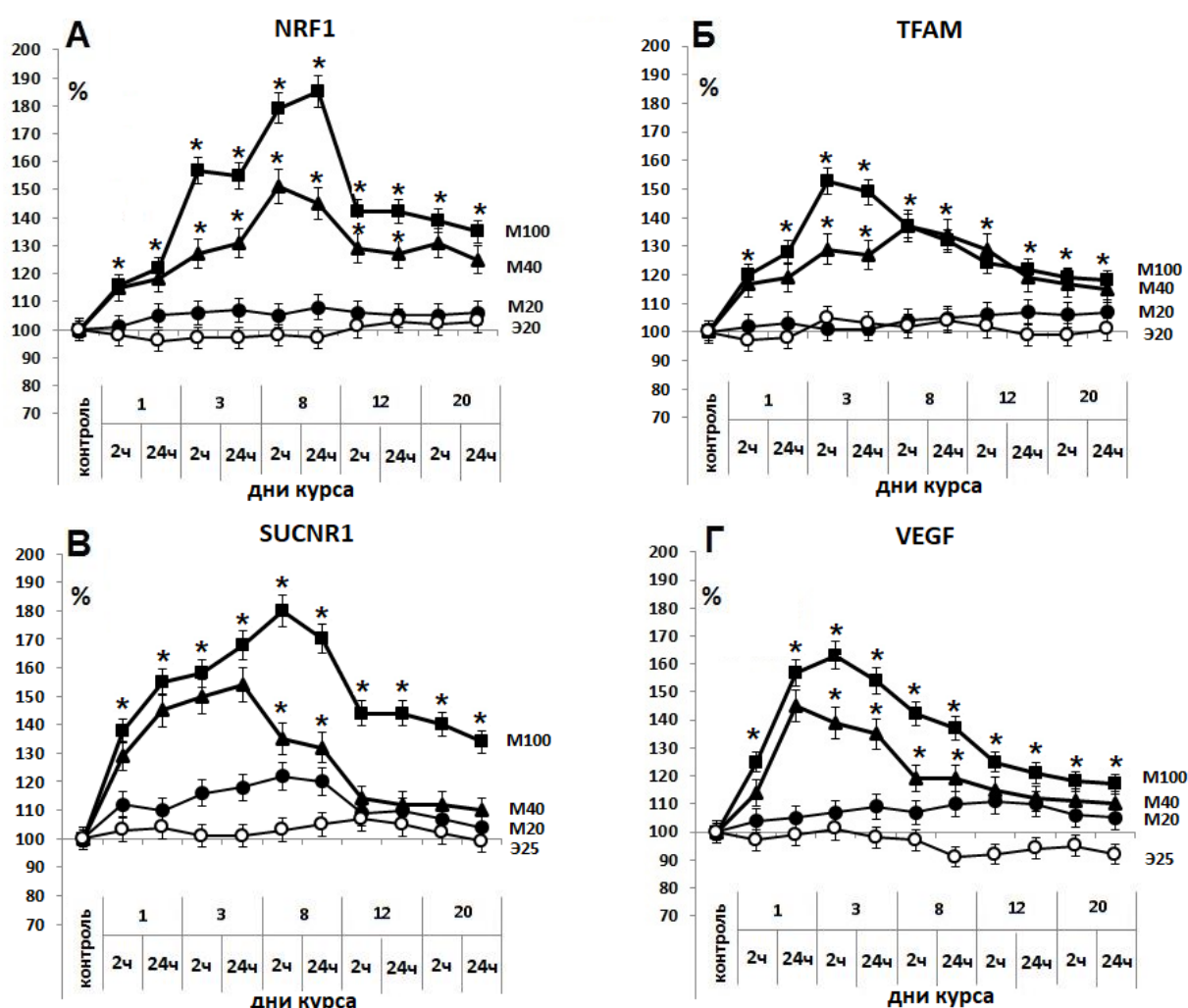


Рисунок 3.12. Динамика экспрессии транскрипционных факторов NRF1 и TFAM, сукцинатного рецептора SUCNR1, фактора роста эндотелия сосудов VEGF в коре головного мозга крыс при курсовом применении (внутрибрюшинные инъекции, ежедневно, 20 дней) мексидола в дозах 20, 40, 100 мг/кг и эмоксипина в дозе 25 мг/кг.

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 ($p < 0,01$).

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. 3.12 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 α и маркеров биогенеза митохондрий - NRF1, TFAM, каталитических субъединиц дыхательной цепи и АТФ-синтазы. Впервые показано, что ключевой механизм повышения толерантности мозга к гипоксии/ишемии - биогенез митохондрий является сукцинат/SUCNR1-опосредуемым.

Выявленный в исследовании факт индукции церебрального митохондриогенеза Мексидолом имеет крайне важную клиническую значимость, поскольку подавление митохондриального биогенеза и дисфункция митохондрий составляют патогенетическое звено нейродегенеративных заболеваний, ишемия-реперфузионных повреждений мозга, возрастных когнитивных нарушений и неврологических расстройств (Austin S., St-Pierre J., 2012; Bratic A., Larsson N. G., 2013).

Таким образом, курсовое применение сукцинатсодержащего препарата Мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат) в дозах свыше 20 мг/кг сопровождается индукцией SUCNR1, VEGF, PGC-1 α , NRF1, TFAM, каталитических субъединиц дыхательных ферментов и АТФ-синтазы, не зависящей от этилметилгидроксипиридина, что свидетельствует о развитии

сукцинат/SUCNR1-опосредованного церебрального митохондрио - и ангиогенеза.

Целью второй серии экспериментов было изучение влияния ишемии на уровень транскрипционного коактиватора PGC-1 α - ключевого регулятора митохондриогенеза, митохондриальной динамики, аэробного метаболизма и энергетического гомеостаза клеток и на уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 α в периинфарктной зоне префронтальной коры головного мозга, а также исследование возможной PGC-1 α -модулирующей активности препаратов, относящихся к разным фармакологическим группам.

3.2. Влияние острой ишемии на уровень транскрипционного коактиватора PGC-1 α и экспрессию белков-маркеров активности PGC-1 α в коре головного мозга

На данном этапе исследований изучали влияние ишемического повреждения головного мозга на уровень транскрипционного коактиватора PGC-1 α и уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 α в коре. Для достижения этой цели методом иммуноблоттинга оценивали уровень экспрессии транскрипционного коактиватора PGC-1 α и PGC-1 α -зависимых белков-маркеров митохондрио-, ангио-, синаптогенеза в перифокальной зоне префронтальной коры головного мозга крысы после фотохимического ишемического повреждения на 3-й, 7-й, 21-й дни постишемического периода. Оценку динамики уровня PGC-1 α -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 α 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 α оказался на 50% ниже по сравнению с интактным контролем, а на 21 сутки снижение составило 25% к исходному уровню (рис. 3.13).

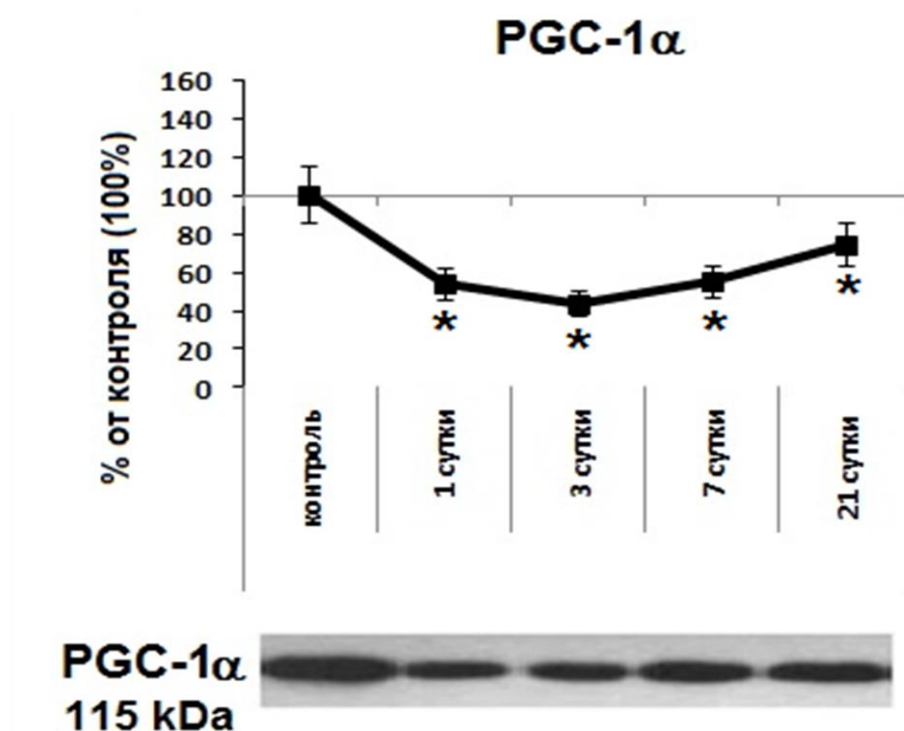


Рисунок 3.13. Динамика уровня экспрессии PGC-1 α в периинфарктной зоне префронтальной коры на 1-21 сутки после фотохимического ишемического повреждения.

Методом иммуногистохимии (ИГХ) показано прогрессирующее уменьшение общего числа PGC-1 α -экспрессирующих нейронов в периинфарктной зоне, а также количества нейронов с высокой ядерной PGC-1 α -иммунореактивностью. Исключение составили 1-е сутки после ишемии, когда количество нейронов с высокой PGC-1 α -иммунореактивностью у ишемизированных животных не отличалось от интактного контроля (рис. 3.14, 3.15). Высокое содержание PGC-1 α в ядре является косвенным подтверждением активации PGC-1 α (3.15).

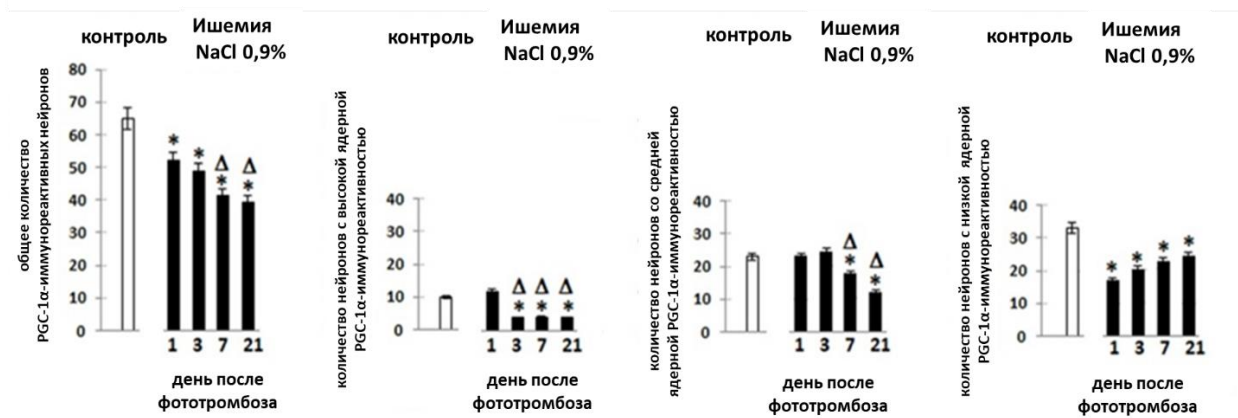


Рисунок 3.14. Динамика уровня активности PGC-1α в периинфарктной зоне префронтальной коры (количество PGC-1α - иммунореактивных нейронов) на 1-21 сутки после фотохимического ишемического повреждения.

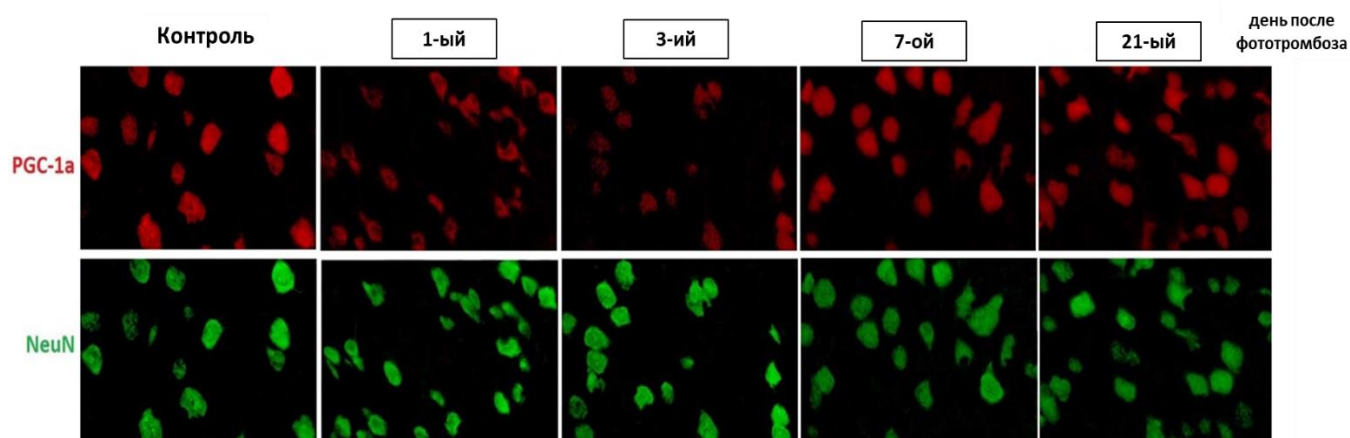


Рисунок 3.15. Динамика уровня активности PGC-1α в периинфарктной зоне префронтальной коры (содержание в ядре) на 1-21 сутки после фотохимического ишемического повреждения.

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. 3.16). Это согласуется с данными литературы о том, что PGC-1α 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).

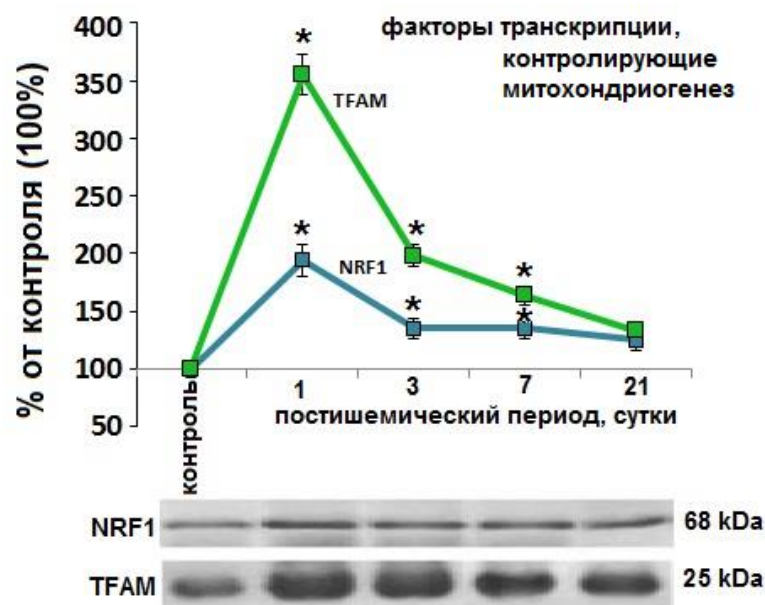


Рисунок 3.16. Динамика уровня экспрессии белков-маркеров активности транскрипционного коактиватора PGC-1α, контролирующих митохондриогенез в перинфарктной зоне в 1-21 сутки постинфарктного периода.

Содержание каталитических субъединиц субстратного участка дыхательной цепи SDHA повышался в первые сутки в 2 раза, NDUFV2 – в 1,5 раза (рис. 3.17). В последующие сроки постинфарктного периода уровень белков-маркеров активности PGC-1α снижался, также как уровень ядерной иммунореактивности PGC-1α.

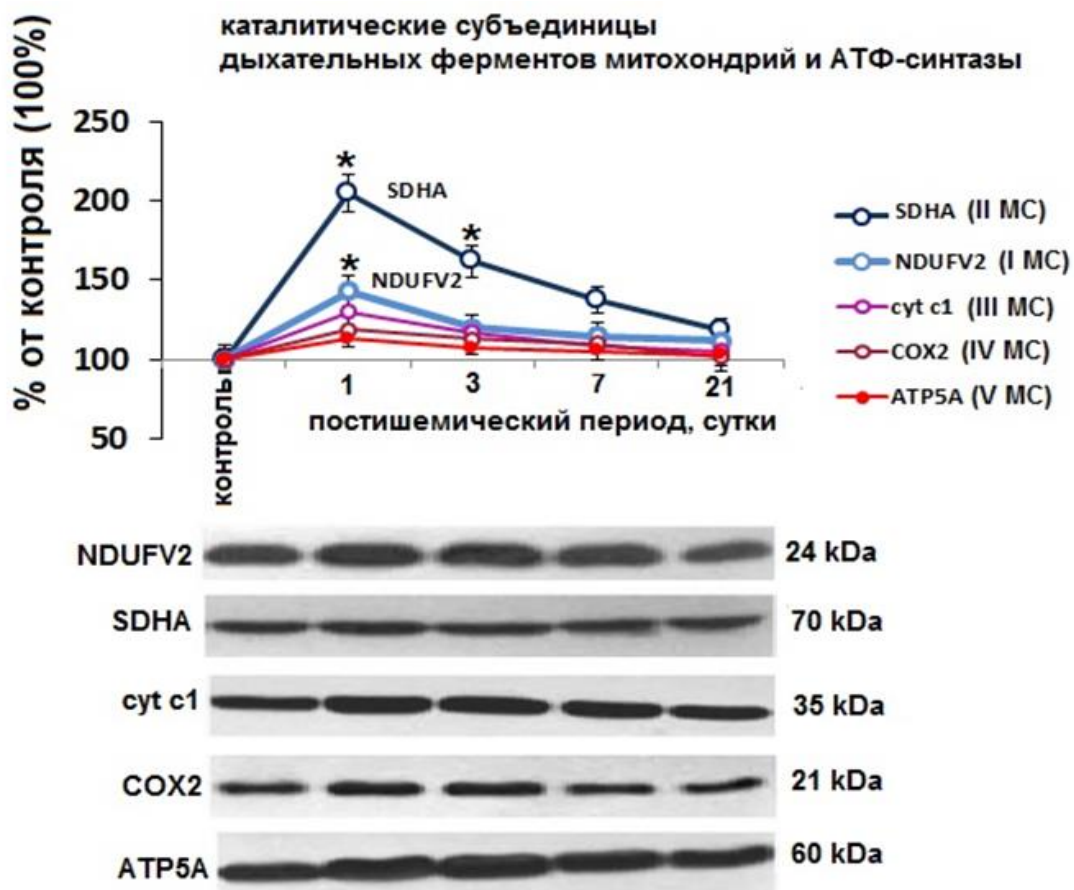


Рисунок 3.17. Динамика экспрессии белков-маркеров активности транскрипционного коактиватора PGC-1 α , контролирующих митохондриогенез в перинфарктной зоне в 1-21 сутки постинфарктного периода.

Содержание синаптофизина повышалось на 30% в первые сутки постинфарктного периода и снижалось в последующие (рис. 3.18).



Рисунок 3.18. Динамика экспрессии синаптофизина SYP (белка-маркера активности транскрипционного коактиватора PGC-1 α), контролирующего синаптогенез в периинфарктной зоне в 1-21 сутки постишемического периода.

Динамика экспрессии VEGF (рис.3.19) значительно отличалась от других белков-маркеров активности PGC-1 α - содержание VEGF было устойчиво повышенным в перифокальной зоне в постишемическом периоде, наиболее выраженное в 1-7 сутки, что может быть связано с зависимостью экспрессии VEGF не только от активности PGC-1 α , но и от гипоксического фактора транскрипции HIF-1 α .

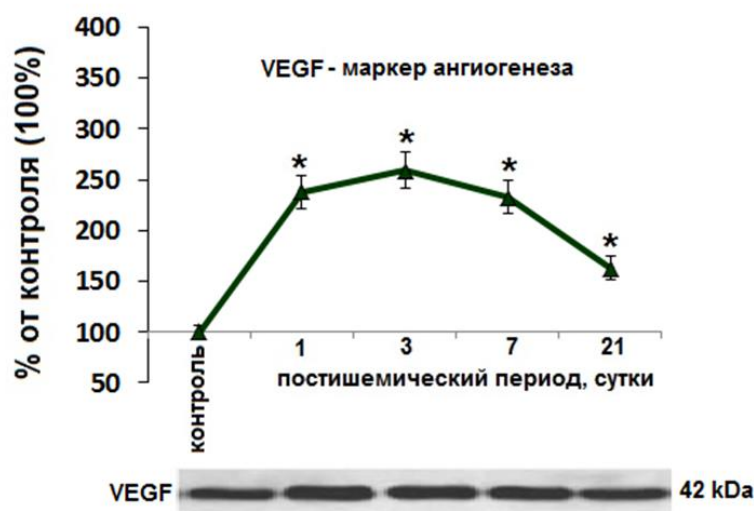


Рисунок 3.19. Динамика экспрессии синаптофизина SYP (белка-маркера активности транскрипционного коактиватора PGC-1 α), контролирующего синаптогенез в периинфарктной зоне в 1-21 сутки постишемического периода.

Таким образом, для оценки активности PGC-1 α 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, была поведена гистологическая обзорная оценка окрашенных гематоксилин-эозином серийных срезов префронтальной коры. Этот подход 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. 3.20) 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.

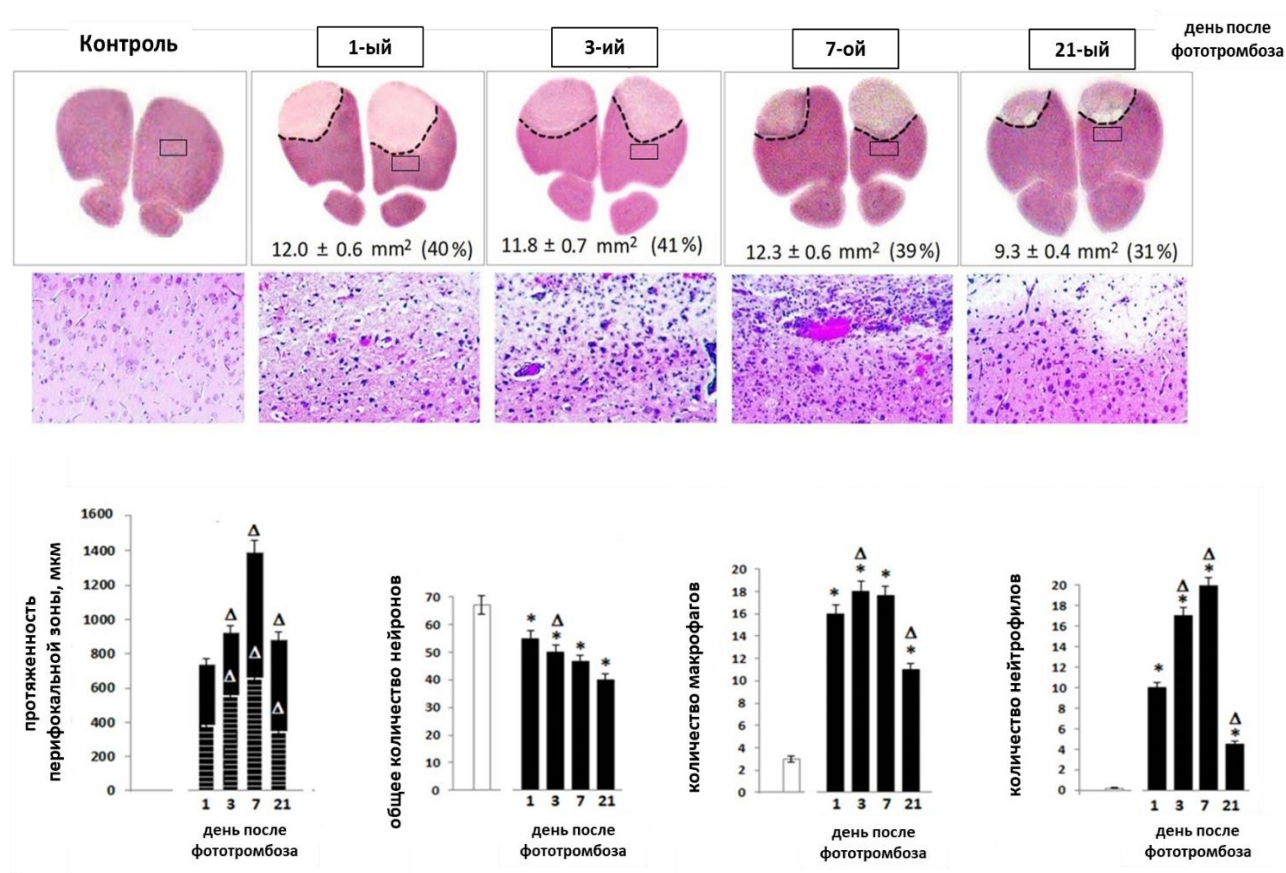


Рисунок 3.20. Динамика клеточного состава (А) и протяженности (Б) перифокальной зоны в 1-21 сутки после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга.

Полученные данные свидетельствуют о нарастании воспалительных явлений к 7-м суткам после ишемии. К 21-м суткам выраженность воспалительной реакции уменьшается: размеры периинфарктной зоны (рис.3.20 А) с клеточными изменениями уменьшались вдвое по сравнению с

7-ми сутками, количество макрофагов при этом снижалось в 2 раза, нейтрофилов - в 3 раза.

3.3 PGC-1 α -модулирующая активность препаратов

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

Индукция и активация транскрипционного коактиватора PGC-1 α - ключевого регулятора энергетического гомеостаза и механизмов толерантности мозга к ишемии рассматривается как одно из перспективных направлений патогенетической таргетной терапии ишемического инсульта. Фармакологические препараты с известной PGC-1 α -модулирующей активностью, которые могли бы выступить в качестве нейропротекторов крайне малочислены. В связи с этим, вызывает большой интерес влияние препаратов с известным нейропротективным действием на активность PGC-1 α .

Цель данного этапа исследования - оценка потенциальной PGC-1 α -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 АКТГ₄₋₇ (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 α и PGC-1 α -зависимых белков-маркеров биогенеза митохондрий (NRF1, TFAM, NDUFV2, SDHA, *cyt c1*, COX2, ATP5A), ангиогенеза (VEGF), синаптогенеза (SYN) в перинфарктной зоне оценивали иммуноблоттингом на протяжении 21 дня постишемического периода (1-е, 3-е, 7-е сутки после фототромбоза и начала терапии и 14 дней

после отмены препарата). Уровень ядерного PGC-1 α оценивали иммуногистохимическим методом. Ранее было показано, что через 24 ч после фототромбоза в периинфарктной зоне очага повреждения отмечалась супрессия PGC-1 α (рис. 3.13), которая сохранялась на протяжении 21 дня после экспериментального инсульта и отражала прогрессивное уменьшение количества нейронов и снижение экспрессии PGC-1 α в отдельных нейронах (рис. 3.15).

В ходе исследования показано, что спустя сутки после фототромбоза, очаг повреждения составил 40% от площади среза префронтальной коры ($p < 0.05$; рис. 3.21). 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 ЭМГП сукцината (Мексидол) и пептида-миметика АКТГ₄₋₇ (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. 3.21). 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. 3.21). Зона поражения в группе, получавшей Мексидол была в 1,5 раза меньше относительно группы с введением Семакса ($p < 0.05$; рис. 3.21).

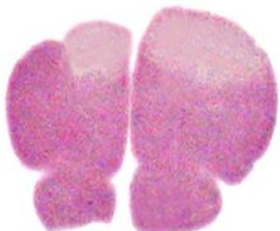
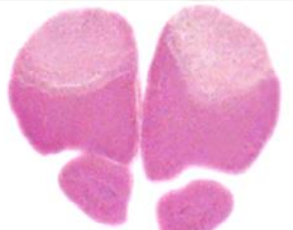
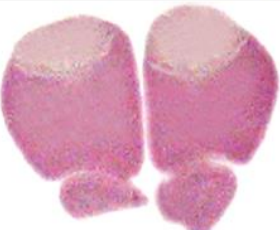
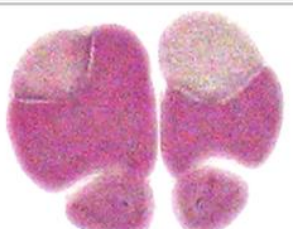
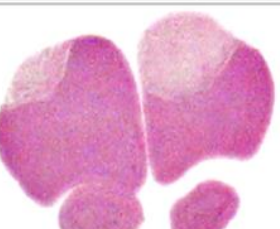
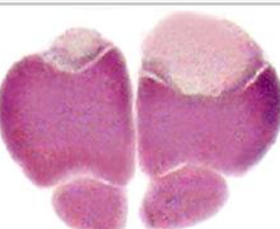
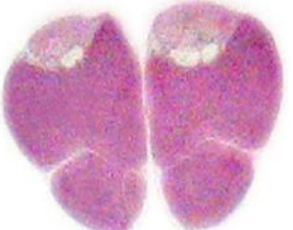
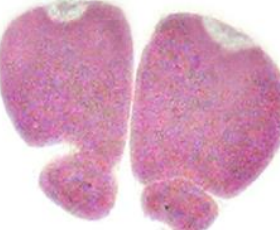
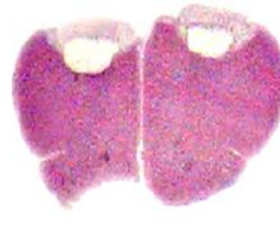
	Ишемия + NaCl 0,9%	Ишемия + ЭМГПс	ИШЕМИЯ + АКТГ ⁴⁻⁷
1 день	 12.0 ± 0.6 mm ² (40%)	 6.6 ± 0.3 mm ² (25%) *	 7.3 ± 0.4 mm ² (29%) *
3 день	 11.8 ± 0.7 mm ² (41%)	 6.7 ± 0.4 mm ² (28%) *	 7.5 ± 0.5 mm ² (30%) *
7 день	 12.3 ± 0.6 mm ² (39%)	 6.9 ± 0.3 mm ² (26%) *	 7.9 ± 0.4 mm ² (29%) *
21 день	 9.3 ±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

Рисунок 3.21. 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 + АКТГ⁴⁻⁷», 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) (Рахिनос, 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 + АКТГ⁴⁻⁷» 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 ± 42 мкм, а в удаленных от центра очага участках – 379 ± 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. 3.22, рис. 3.23). При однократном введении Мексидола через 2 ч после фототромбоза протяженность периинфарктной зоны, примыкающей к центральному и боковым участкам очага уменьшилась на 40% и 60% соответственно ($p < 0.05$), по сравнению с группой «Ишемия + NaCl 0,9%», а относительно получавших Семакс – на 15% и 25% ($p < 0.05$). Введение препаратов сопровождалось сохранением количества нейронов на уровне контроля. При однократном введении Мексидола количество макрофагов и нейтрофилов в перифокальной зоне было меньше в 2 и 3 раза ($p < 0.05$) соответственно, в сравнении с группой «Ишемия + NaCl 0,9%», при введении Семакса – на 25% и 15% ($p < 0.05$; рис. 3.22, рис. 3.23).

На 3-и сутки после фототромбоза в группе «Ишемия + NaCl 0,9%», протяженность периинфарктной зоны увеличилась на 30% ($p < 0.05$) в ее центральном участке и на 50% ($p < 0.05$) в удаленных от центра некротического очага участках в сравнении с первыми сутками после ишемии. Количество нейронов при этом уменьшилось на 10% ($p < 0.05$), количество макрофагов увеличилось на 15% и нейтрофилов и в 3 раза

($p < 0.05$) (рис. 3.22, рис. 3.23), что может быть связано с микроциркуляторными дегенеративными явлениями, выраженной вазодилатацией, повышением сосудистой проницаемости и микрокровоизлияниями (рис. 3.22). В результате 3-дневного введения Мексидола протяженность зоны ишемической полутени увеличилась на 15% в сравнении с 1 сутками, а при введении Семакса увеличилась для центрального и удаленных от центра участков на 20% и 40%, соответственно ($p < 0.05$). Протяженность зоны ишемической полутени у крыс была меньше на 30% («Ишемия + ЭМГПс») и 20% («Ишемия+АКТГ₄₋₇») соответственно по сравнению с группой «Ишемия + NaCl 0,9%». Количество нейронов в перифокальной зоне в результате 3-дневного введения препаратов не отличалось от контроля. На 3 сутки введения Мексидола количество макрофагов и нейтрофилов в этой зоне увеличивалось на 25% и в 3 раза ($p < 0.05$) в сравнении с 1 сутками, а после 3-дневного введения Семакса – на 30% и 3 раза ($p < 0.05$). При сравнении с группой «Ишемия + NaCl 0,9%» инфильтрация периинфарктной зоны макрофагами и нейтрофилами была достоверно ниже в 2 и 3 раза ($p < 0.05$), соответственно, только для группы «Ишемия + ЭМГПс» (рис. 3.22, рис. 3.23).

На 7-е сутки после фототромбоза расширение зоны ишемической полутени продолжалось: на 50 и 20% для центральных и удаленных от центра участков, соответственно, в сравнении с 3 сутками ($p < 0.05$). Усиливалась инфильтрация этой зоны нейтрофилами (на 40%; $p < 0.05$), количество нейронов и макрофагов при этом значимо не менялось в сравнении с 3-ми сутками.

7-дневный курс Мексидола сопровождался ограничением распространения зоны полутени и увеличением количества нейтрофилов на 20% ($p < 0.05$) по сравнению с 3-м днем постишемического периода. 7-дневный 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. 3.22, рис. 3.23). На 7 день постишемического периода в группах «Ишемия+ЭМГПс» и «Ишемия+АКТГ₄₋₇» протяженность пенумбры в сравнении 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% с Мексидолом и 25% Семаксом, а нейтрофилов – ниже на 60% (Ишемия + ЭМГПс) ($p<0.05$; рис. 3.22, рис. 3.23). Количество нейтрофилов для групп «Ишемия+NaCl0,9%» и «Ишемия+АКТГ₄₋₇» 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+АКТГ₄₋₇». 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+АКТГ₄₋₇» (рис. 3.22, рис. 3.23). Количество нейронов было выше на 40% ($p<0.05$) в группах животных, получавших терапию в сравнении

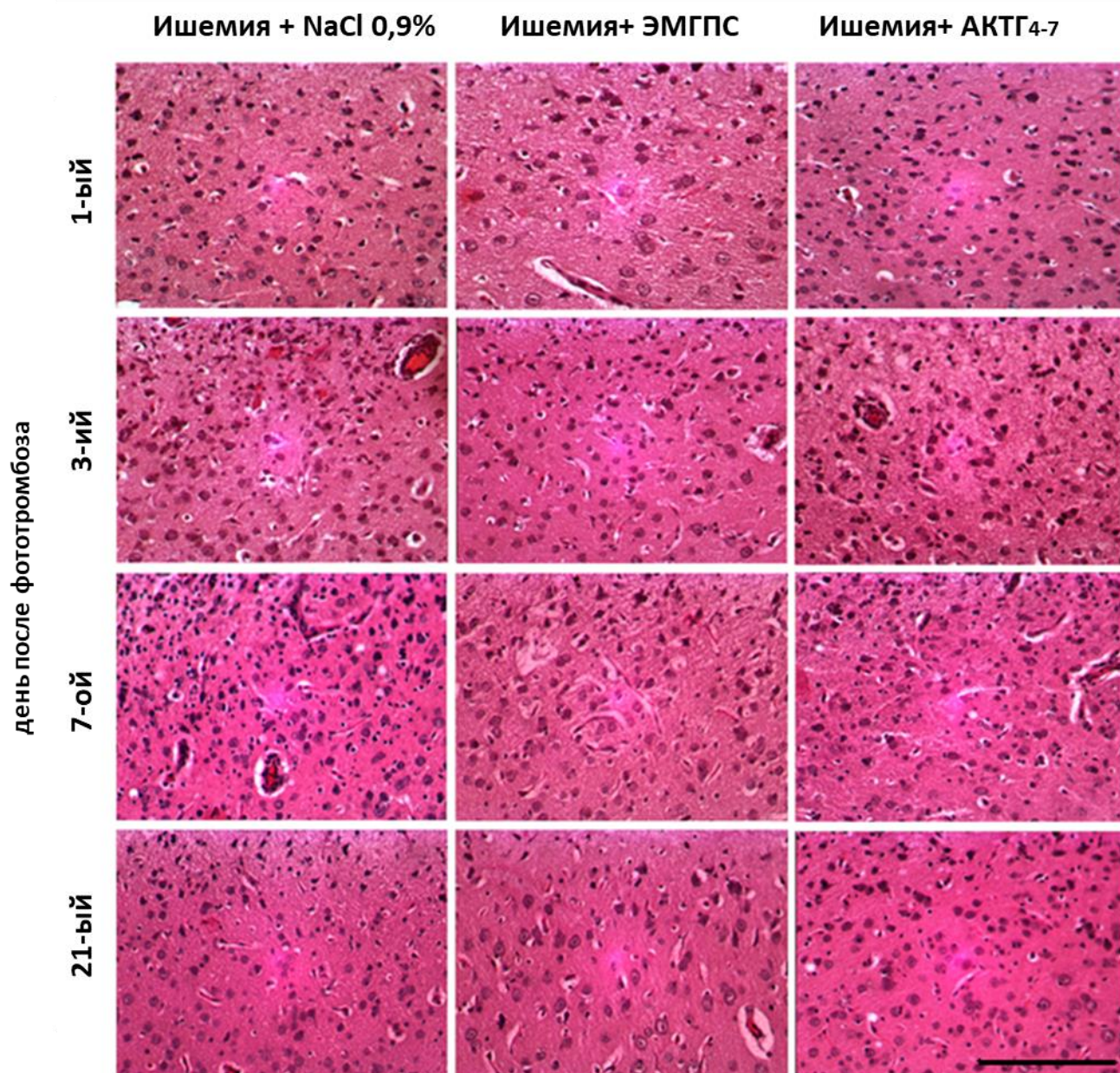


Рисунок 3.22. Репрезентативные микрофотографии патоморфологических изменений в префронтальной коре в течение 21 дня после фототромбоза и при 7-дневных курсах введения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) и аналога АКТГ₄₋₇). Микрофотографии периинфарктной зоны (зона полутени). Окрашивание гематоксилин-эозином. Объектив x20. Маркер масштаба 100 мкм.

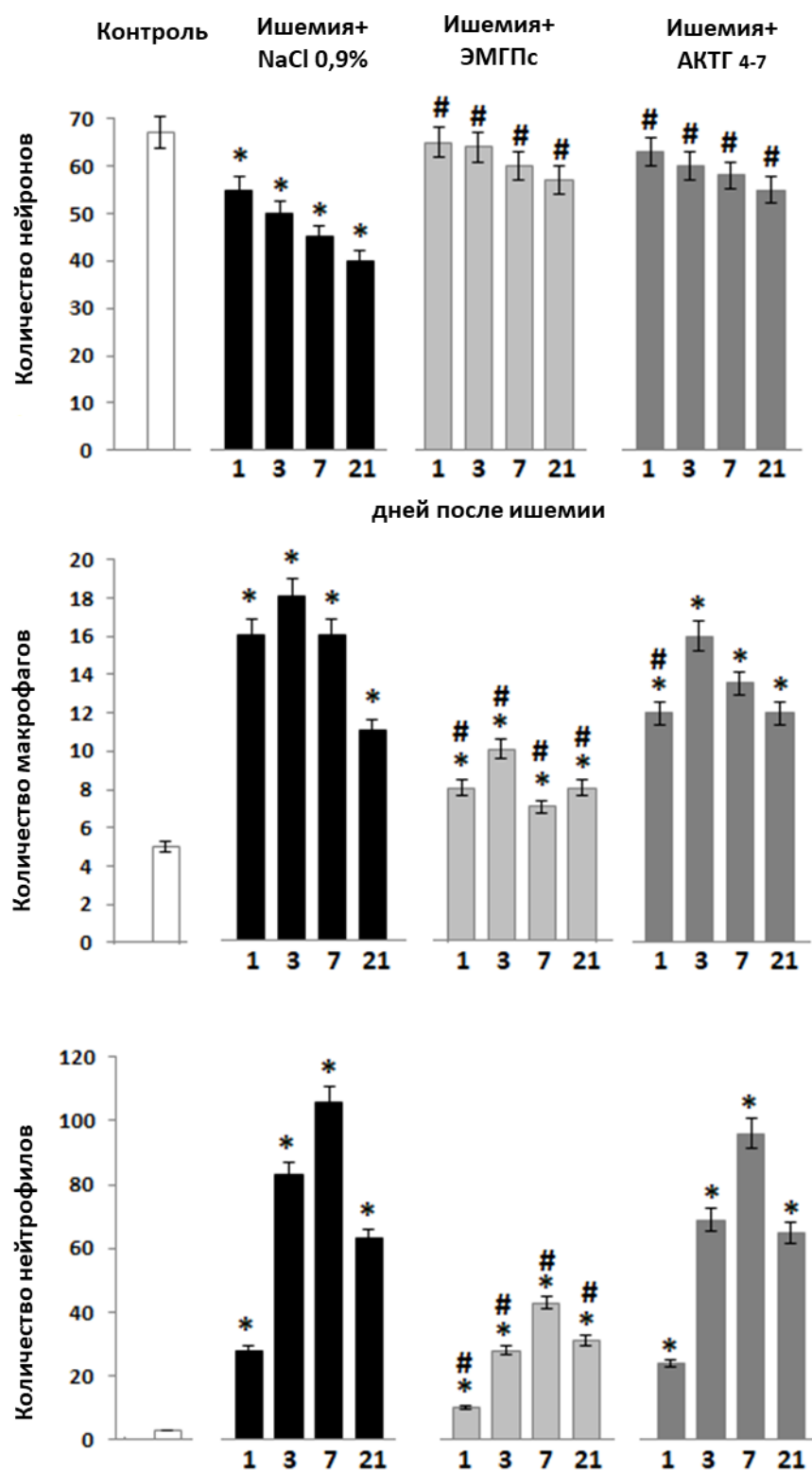


Рисунок 3.23. Влияние 7-дневных курсов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (ЭМГПс) и аналога АКТГ₄₋₇ на клеточный профиль перифокальной зоны на 1-е, 3-и, 7-е и 21-е сутки после фототромбоза сосудов префронтальной коры. Данные представлены в виде средних значений числа клеток получены при обсчете шести

рандомизированных микрофотографий (изображения соответствовали площади перинфарктной зоны $0,1 \text{ мм}^2$) в трех срезах у четырех крыс ($M \pm SEM$; * - $p < 0,01$; данные отличаются от контрольной группы; # - $p < 0,01$; данные отличаются от группы «Ишемия+NaCl 0,9%»)

Таким образом, 7-дневные курсы применения Мексидола (ЭМГПс) и Семакса (АКТГ₄₋₇) сопровождались сохранением нейронов в области пенумбры в обеих группах. Наибольшей эффективностью обладал препарат Мексидол, что, по-видимому, может быть связано с выраженным ограничением инфильтрации пенумбры провоспалительными клетками, цитотоксическая активность которых провоцирует механизмы нейрональной гибели.

3.3.2 Влияние нейропротективной терапии на экспрессию и активность PGC-1 α в зоне перинфарктной зоны

Показано, что фототромбоз префронтальной коры головного мозга крыс сопровождался снижением уровня белка PGC-1 α в цитоплазматическом экстракте ткани перинфарктной зоны на протяжении всего периода наблюдений (21 день после ишемического повреждения) (рис. 3.24 А; рис. 3.25). Максимальное снижение PGC-1 α 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 α -экспрессирующих нейронов в зоне пенумбры, что было показано в разделе 3.2; 2 - снижения синтеза PGC-1 α в сохранившихся нейронах пенумбры; 3 - транслокации активированного PGC-1 α в ядро нейронов и снижения его содержания в цитоплазме. Действительно, именно на первые сутки постишемического периода приходится пик активности PGC-1 α , о чем свидетельствует выраженная индукция PGC-1 α -зависимых белков (рис. 3.24 В-Н, J, L; рис. 3.25). 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 α (Kelly, 2004). Для каталитических субъединиц цитохромного участка дыхательной цепи митохондрий (cyt c1, COX2) и АТФ-синтазы (ATP5A) увеличение содержания составило 20% ($p < 0.05$; рис. 3.23 F, G, H; рис. 3.24). Активность PGC-1 α увеличивалась сопряженно с увеличением экспрессии сукцинатного рецептора SUCNR1 (рис. 3.23 I; рис. 3.24).

К 7-му и 21-му дню постишемического периода содержание белков-маркеров активности PGC-1 α поступательно снижалось, достигая к концу наблюдений уровня контрольных животных (рис. 3.24; рис. 3.25). В этот же период уровень PGC-1 α 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 α , на ослабление его транслокации в ядро нейронов.

Введение Мексидола через 2 ч после фототромбоза сосудов ПФК сопровождалось через 24 ч поддержанием экспрессии PGC-1 α в ткани пенумбры на уровне, сопоставимом с контролем, превышающим экспрессию PGC-1 α в группе «Ишемия + NaCl 0,9%» на 30% ($p < 0.01$; рис. 3.24 A; рис. 3.25). Эффект поддержания экспрессии PGC-1 α на контрольном уровне сохранялся на протяжении 7-дневного курса и в течение 14 дней после окончания курса препарата (рис. 3.24 A; рис. 3.25).

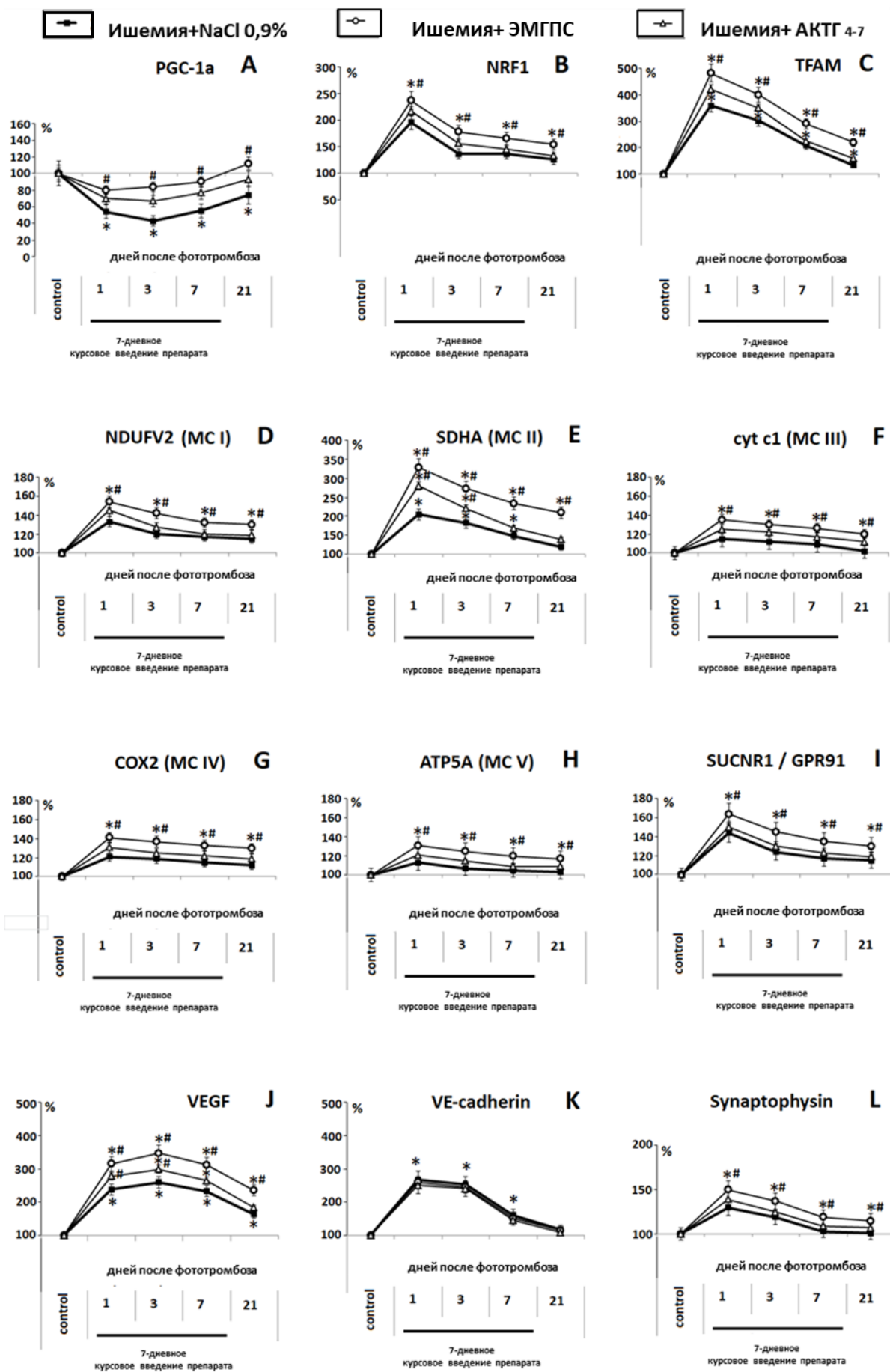


Рисунок 3.24. Влияние 7-дневного курса ЭМГП сукцината (Мексидола, 100 мг/кг, в/б, ежедневно) и аналога АКТГ₄₋₇ (Семакса, 25 мкг/кг, и/н, ежедневно) на экспрессию PGC-1 α и белков-маркеров активности PGC-1 α в зоне пенумбры на протяжении 21 дня постишемического периода. * - данные отличаются от группы «контроль» ($p < 0.01$), # - данные отличаются от группы «Ишемия + NaCl 0,9%» ($p < 0.01$);

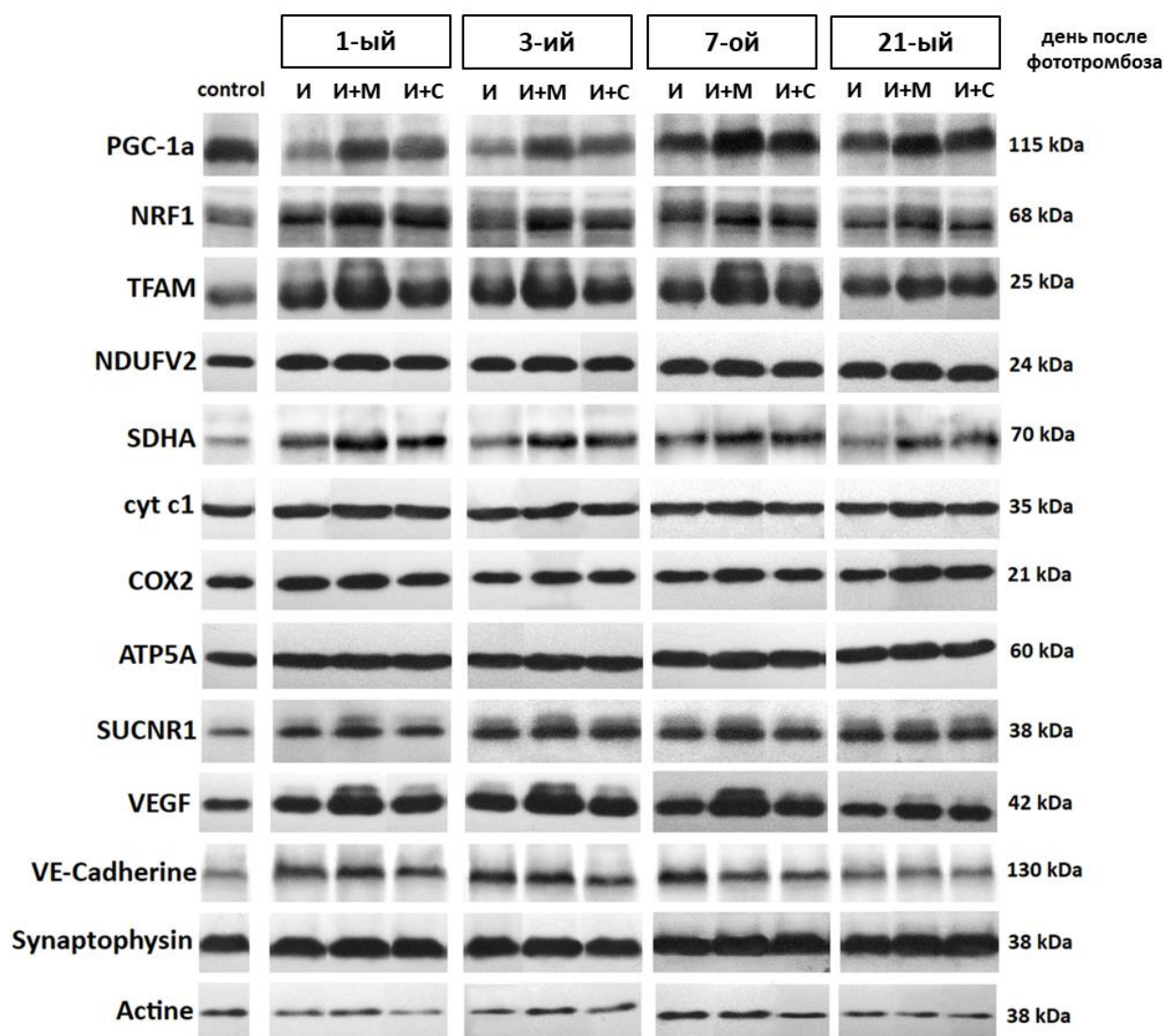


Рисунок 3.25. Влияние 7-дневного курса ЭМГПс (Мексидол, 100 мг/кг, в/б, ежедневно) и аналога АКТГ₄₋₇ (Семакса, 25 мкг/кг, и/н, ежедневно) на экспрессию PGC-1 α и белков-маркеров активности PGC-1 α в зоне пенумбры на протяжении 21 дня постишемического периода. Фотографии репрезентативных иммуноблотов.

Курсовое введение Мексидола сопровождалось увеличением содержания в ткани перифокальной зоны PGC-1 α -зависимых белков, причем

уровень их экспрессии значимо превышал выявленный для группы «Ишемия + NaCl0,9%» (рис. 3.24, рис. 3.25). Наиболее выраженным оказалось влияние Мексидола на активность PGC-1 α 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 (сyt c1, COX2) и АТР5А также был достоверно выше (на 20%, $p<0.05$) в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%». Введение Мексидола сопровождалось индукцией и активацией PGC-1 α 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 (на 20% по сравнению с ишемизированными животными без лечения, $p<0,01$; рис. 3.24 I; рис. 3.25).

Курсовое введение Семакса ишемизированным животным в течение 7 дней также, как в случае с Мексидолом сопровождалось поддержанием экспрессии PGC-1 α на уровне достоверно более высоком (на 20%, $p<0.05$) по сравнению с группой «Ишемия+NaCl0,9%» в течение 21 дня постишемического периода (рис 3.24 А, рис. 3.25). Активность PGC-1 α , оцениваемая по уровню экспрессии PGC-1 α -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 α проявлялись в течение 3 дней постишемического периода: уровень экспрессии NRF1 был выше на 20% ($p<0,05$), TFAM – на 50% ($p<0,01$), NDUFV2 – на 20% ($p<0,05$), SDHA – на 50% ($p<0,01$), VEGF – на 40% ($p<0,01$) в сравнении с ишемическими крысами (рис. 3.24; рис. 3.25).

В работе была также оценена 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 α -зависимой. Регулятором экспрессии VE-кадгерина

служит транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией, HIF-1 α - один из ключевых факторов формирования адаптивных реакций в ишемизированном мозге (Bras et al., 2007; Geiseler et al., 2018; Tang et al., 2014). Примененные препараты не влияли на экспрессию VE-кадгерина.

Таким образом, методом вестерн-блот анализа было показано, что ишемическое повреждение коры головного мозга сопряжено с устойчивой супрессией PGC-1 α в перифокальной зоне, что связано, прежде всего, с прогрессирующей потерей PGC-1 α -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 α , сопоставимого с контролем. На фоне увеличения содержания PGC-1 α в перинфарктной зоне регистрировали значимо более высокий в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%» уровень белков-маркеров активности PGC-1 α . Применение терапевтических доз Мексидола и Семакса показало больший нейропротективный потенциал сукцинатсодержащего препарата Мексидол, что, вероятно, сопряжено с индукцией сукцинатного рецептора, имеющего ключевое значение в реализации механизмов толерантности мозга к ишемии (Hamel,2014).

3.3. Влияние нейропротекторной терапии на экспрессию и ядерную транслокацию PGC-1 α в нейронах перинфарктной зоны

С целью выявить уровень экспрессии PGC-1 α в индивидуальных нейронах и содержание PGC-1 α в ядрах нейронов (отражает активацию PGC-1 α) было выполнено иммуногистохимическое окрашивание нейронов пенумбры. В срезах ПФК контрольных крыс количество нейронов с высокой и средней ядерной PGC-1 α -иммунореактивностью составляло 15% и 35%, соответственно, от общего количества нейронов (обсчет производили в участках, соответствующих расположению пенумбры, на площади среза 0,1 мм²) (рис. 3.26, рис. 3.27). Фототромбоз сосудов ПФК вызывал через 24 ч

снижение общего количества PGC-1 α -иммунопозитивных нейронов на 20% ($p<0.05$), при этом количество нейронов с высокой и средней PGC-1 α -иммунореактивностью не менялось, но их доля в общем количестве PGC-1 α -экспрессирующих нейронов увеличилась на 7% и 10%, соответственно. Выявленные изменения в количественном соотношении нейронов, различающихся по уровню экспрессии PGC-1 α , свидетельствуют о ранней (в течение 24 ч) постишемической гибели нейронов с низкой PGC-1 α -иммунореактивностью, потенциально наименее резистентных к ишемии

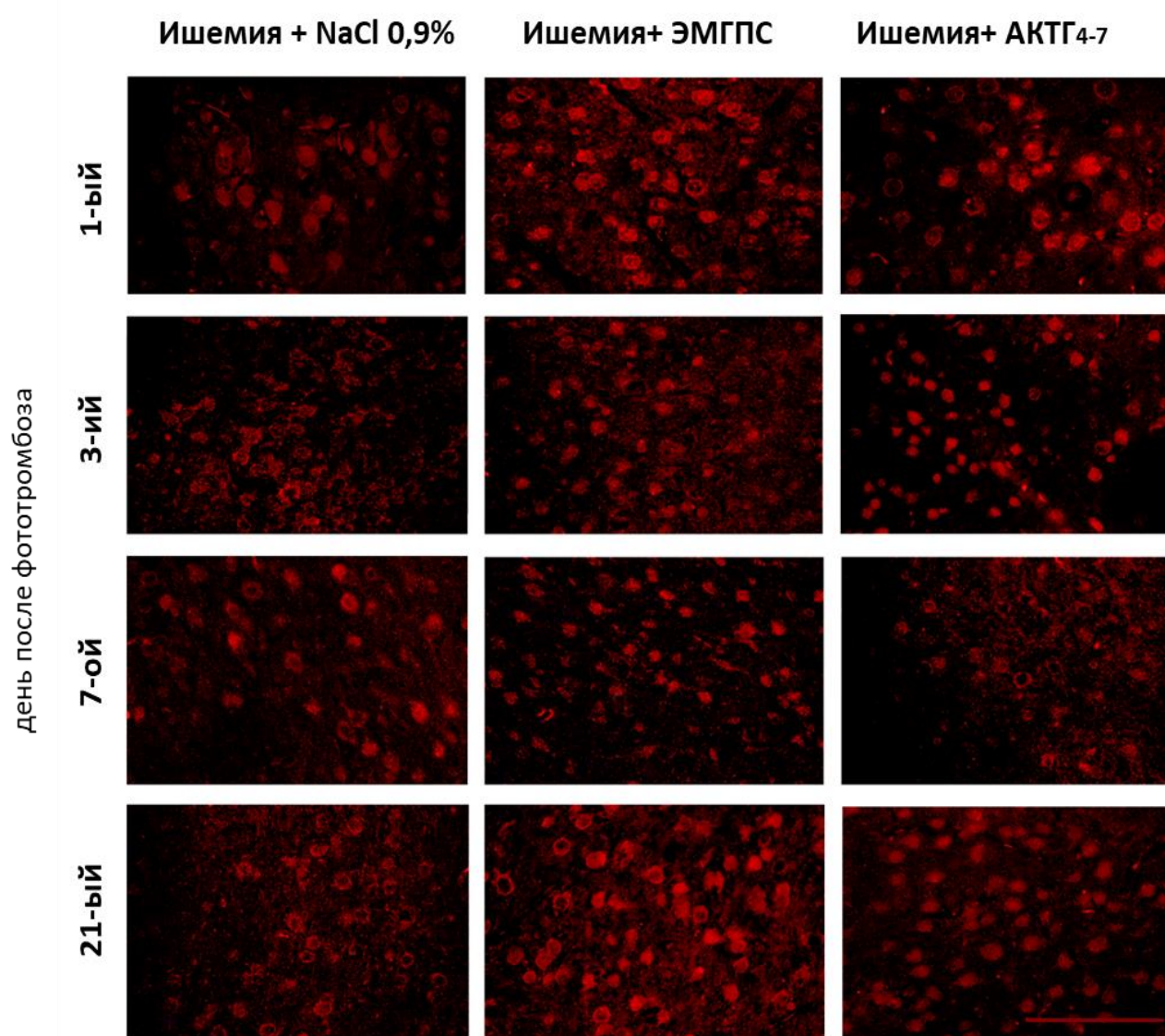


Рисунок 3.26. Влияние 7-дневных курсов ЭМГПС (100 мг/кг, в/б, ежедневно) и аналога АКТГ₄₋₇ (25 мкг/кг, и/н, ежедневно) на экспрессию и ядерно-цитозольную локализацию PGC-1 α в нейронах пенумбры на протяжении 21 дня постишемического периода. Репрезентативные микрофотографии

иммуногистохимически окрашенных срезов префронтальной коры головного мозга крыс. Объектив x20. Маркер масштаба 100 мкм.

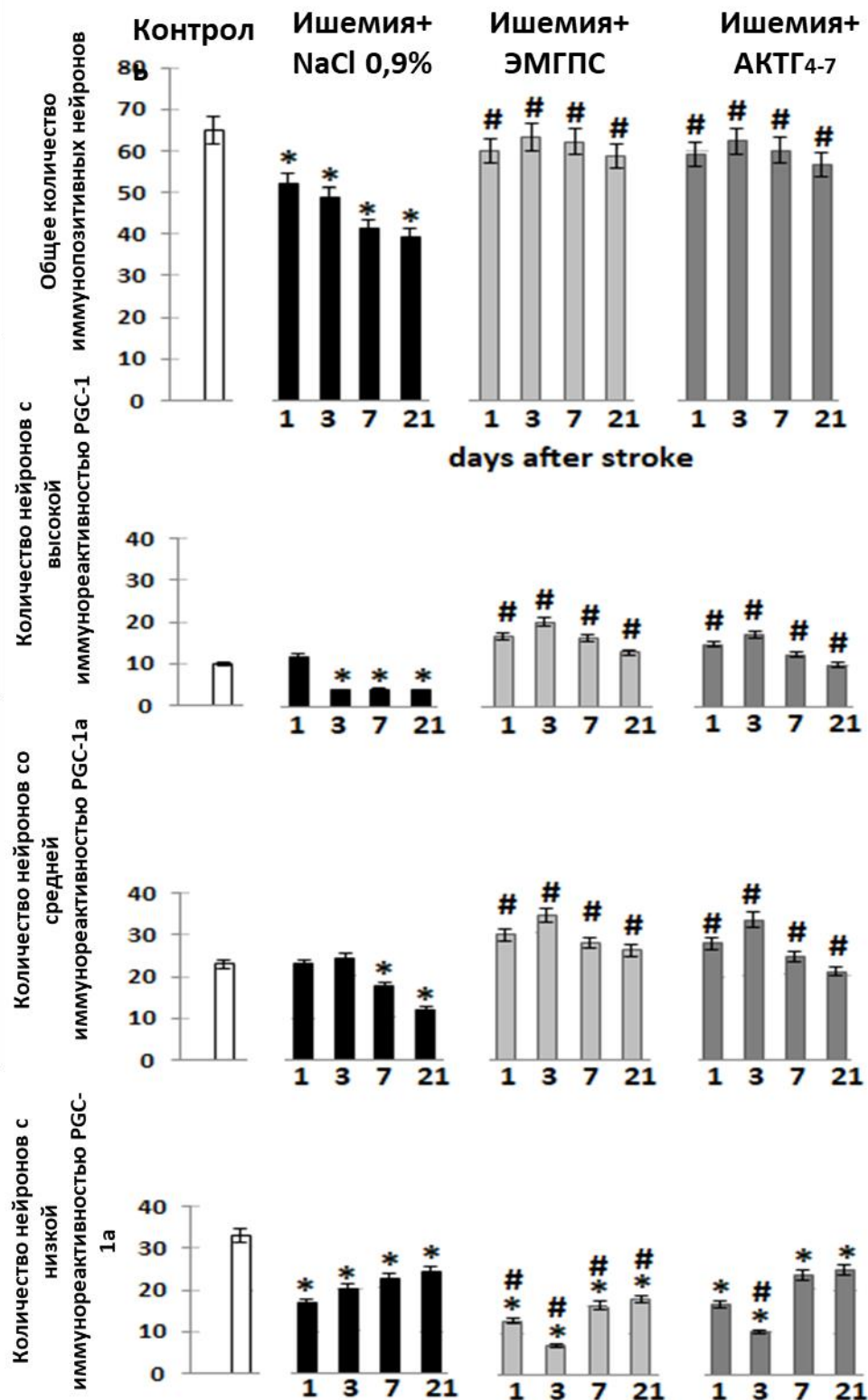


Рисунок 3.27. Влияние 7-дневных курсов ЭМГПС (Мексидола) и аналога АКТГ₄₋₇ (Семакс) на уровень экспрессии и ядерную транслокацию PGC-1α в индивидуальных нейронах через 1-е, 3-и, 7-е и 21-е сутки после фототромбоза сосудов ПФК. Средние величины числа клеток получены при

обсчете шести рандомизированных микрофотографий (изображения соответствовали площади пенумбры 0,1 мм²) в трех срезах у четырех крыс ($M \pm SEM$; * - $p < 0,01$; данные отличаются от группы «control»; # - $p < 0,01$). PGC-1 α -IR – PGC-1 α -immunoreactivity.

Однократное введение Мексидола и Семакса через 2 ч после фототромбоза способствовало сохранению в течение 24 ч постишемического периода количества PGC-1 α -иммунопозитивных нейронов пенумбры на уровне сопоставимом с контролем (на 15% выше в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%», $p < 0,05$). При этом количество нейронов с высокой и средней ядерной PGC-1 α -иммунореактивностью увеличивалось в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%» на 40% и 30% ($p < 0,05$), соответственно, в группе «Ишемия + ЭМГПс» и на 25% и 20% ($p < 0,05$) в группе «Ишемия+АКТГ₄₋₇» (рис. 3.21, рис. 3.22). Таким образом, применение препаратов Мексидол и Семакс не только способствовало поддержанию общего количества PGC-1 α -экспрессирующих нейронов в пенумбре на уровне контроля, но и значимому увеличению доли нейронов с высоким и средним уровнем ядерной PGC-1 α -иммунореактивности, т.е. активации PGC-1 α .

Через 3 дня после фототромбоза общее количество PGC-1 α -экспрессирующих нейронов уменьшилось на 10%, а нейронов с высокой ядерной PGC-1 α -иммунореактивностью на 70% ($p < 0,05$) в сравнении с первыми сутками после ишемии. Трехдневные курсы Мексидола и Семакса значимо не влияли на общее количество PGC-1 α -экспрессирующих нейронов, нейронов с высокой и средней ядерной PGC-1 α -иммунореактивностью по сравнению с однократным введением препаратов, однако их количество в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%» было выше на 30%, в 4 и 1,4 раза, соответственно ($p < 0,05$; рис. 3.26, рис. 3.27).

Через 7 и 21 сутки после фототромбоза количество PGC-1 α -экспрессирующих нейронов и нейронов со средней ядерной PGC-1 α -

иммунореактивностью прогрессивно уменьшалось, достигнув к 21 дню наблюдений 75% и 50% ($p<0.05$), соответственно, по сравнению с 1-ми сутками постишемического периода (рис. 3.26, рис. 3.27). Поступательное постишемическое (3-21 сутки) снижение уровня ядерной активированной формы PGC-1 α , опосредующего множественные нейропротекторные механизмы, было сопряжено с прогрессирующей гибелью нейронов в пенумбре, наблюдаемой на протяжении 21 дня после экспериментального инсульта (раздел 3.1). 7-дневные курсы введения Мексидола и Семакса сопровождались поддержанием в пенумбре значимо большего количества нейронов с высокой ядерной PGC-1 α -иммунореактивностью (в 3 раза Мексидол и 2,5 раза Семакс; $p<0.05$) в сравнении с группой «stroke» как на 7-й, так и 21-й день. Общее количество PGC-1 α -экспрессирующих нейронов на 21-й день наблюдений также было достоверно выше (в 1,5 раза с Мексидолом и 1,4 раза с Семаксом; $p<0.05$) в сравнении с группой «Ишемия+NaCl0,9%» (рис. 3.26, рис. 3.27).

Таким образом, курсовое применение препаратов Мексидол и Семакс увеличивало экспрессию и стимулировало ядерную транслокацию (активацию) PGC-1 α , что было сопряжено с выживанием нейронов пенумбры.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Механизмы патологических процессов, запускаемых ишемией и влияние на них нейропротекторов довольно активно изучаются в экспериментальных моделях на животных. В настоящее время выявлена сложная цепь метаболических и клеточных реакций, вызываемых нарушениями мозгового кровообращения (Ginsberg M.D., 2008; Mattson M.P. et al., 2000). Ишемический каскад характеризуется комплексом сложных и многоуровневых процессов, различные аспекты которых активируются в зависимости от времени от начала ишемии, выраженности снижения кровотока, интенсивности метаболических процессов. Известно, что каждый этап ишемического каскада является потенциальной мишенью для терапевтических воздействий и чем раньше прерывается каскад, тем больший эффект можно ожидать от терапии. При этом, все имеющиеся на сегодняшний день нейропротекторы, имеют те или иные недостатки, поэтому разработка новых подходов к терапии и профилактике инсульта остается важнейшей задачей фундаментальной медицины (Романова Г.А., 2002; Ginsberg M.D., 2008).

Межнейрональная коммуникация в нервной системе основана на чередовании электрических и химических процессов, которые обеспечивают синаптическую передачу информации. Современные исследования способствовали расширению представлений о механизмах нервных процессов – когнитивных функций, организации моторики и поведения. Известно, что повреждение передних префронтальных отделов неокортекса у крыс наряду с гиппокампом играют важную роль в интегративной деятельности мозга, связанной с обучением и памятью (Jones M.W., 2002). Повреждение этих областей коры приводит к значительным нарушениям когнитивных функций и, в частности, к нарушениям пространственной памяти (Романова Г.А., 2010). Исследованию механизмов нарушения и восстановления когнитивных функций мозга, связанных с неокортексом

посвящен ряд исследований (Нох Т.Е., 2001; Jones M.W., 2002). В то же время участие нейротрансмиттерных и регуляторных систем мозга в защитных и регенеративных процессах, способствующих восстановлению способности к обучению, активно изучается.

Известно, что ключевую роль в осуществлении передачи сигнала в синапсе играют нейромедиаторы. Выделяют две основные группы нейромедиаторов - аминокислоты (глицин, глутамат и аспартат) и биогенные амины. Глутаматергические нейроны в норме играют важнейшую роль в пределах ЦНС. Особенно широко они представлены в коре больших полушарий, откуда их проекции достигают гиппокампа, хвостатого ядра, миндалины, прилежащего ядра, верхних холмиков и красного ядра среднего мозга, ядер моста (Бонь Е.И., 2021). Крупное скопление глутаматергических нейронов находится и в гиппокампе. Глутамат опосредует протекание как быстрых (деполяризация мембраны), так и медленных (долговременная потенция) синаптических процессов. Он участвует в регуляции выделения гормонов гипофиза, миграции нейронов в ходе индивидуального развития. Также известно, что повышенный выброс глутамата вследствие длительной стимуляции глутаматергических путей при ишемии вызывает эксайтотоксичный эффект, обусловленный массивным входом Ca^{2+} в клетку, запускающий механизм клеточной гибели (Stefanic P., Dolenc M.S., 2004).

Рядом авторов ранее высказывалось мнение, что одним из механизмов регуляции уровня глутамата при острых ишемических инсультах могут быть антитела к нему, вырабатывающиеся на его избыточное длительное высвобождение в ЦНС, а также антитела к глутаматным рецепторам (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001). Действительно, антитела к нейромедиаторам стали объектом исследований в разрезе проблемы дисрегуляции нейроиммунных взаимодействий (Крыжановский Г.Н., 2002; Евсеев В.А., 2007), лежащих в основе нейродегенеративных нарушений, ишемических повреждений головного мозга, психоэмоционального стресса. Так, ранее было показано, что интраназальное введение антител к глутамату

способствует сохранению УРПИ у крыс с ишемическим повреждением мозга, вызванным двусторонним фототромбозом сосудов префронтальной коры (Романова Г.А., Давыдова Т.В. и др., 2010), выявив защитное действие антител к глутамату в условиях усиленной продукции глутамата при острой ишемии. Представляло интерес изучение влияния антител к глутамату (АТ-ГЛУ) на содержание моноаминов – дофамина и серотонина и их метаболитов в префронтальной коре и гиппокампе в остром периоде инсульта на модели фототромбоза префронтальной области коры мозга крыс.

Полученные ранее данные (Давыдова Т.В., 2010) показали протективное действие АТ-ГЛУ на когнитивные функции мозга при нейродегенеративной патологии, благодаря их способности снижать усиленную продукцию глутамата и тем самым предотвращать гибель нейронов, что позволяет объяснить антиамнестические эффекты АТ-ГЛУ, полученные в при остром ишемическом повреждении префронтальной коры. Поскольку в процессах обучения и памяти ключевую роль играют нейромедиаторные взаимодействия, то можно предположить, что изменения уровня моноаминов, в префронтальной коре и гиппокампе при острой ишемии являются, выявленные в рамках исследования, является отражением перестройки пластических процессов, происходящих в условиях снижения эксайтотоксичности под действием АТ-ГЛУ в исследуемых структурах ишемизированного головного мозга.

Полученные данные позволяют рассматривать антитела к глутамату как перспективных нейропротекторов, которые в дальнейшем могут найти свое место при разработке иммунологических подходов к патогенетической терапии ишемии, острых и хронических нейродегенеративных повреждений головного мозга за счет торможения высвобождения возбуждающих, обладающих эксайтотоксическим действием.

Значительное количество пептидов, синтезируемых в нейронах, выступает в качестве нейромодуляторов, т. е. веществ, способных оказывать влияние на действие «классических» сигнальных веществ (медиаторов).

Крупные белковые молекулы неспособны из-за своих размеров накапливаться в синаптических пузырьках, высвобождаться из пресинаптических терминалей и взаимодействовать с рецепторами постсинаптической клетки. Поэтому часто в ходе нормального развития от них случайным образом отщепляется цепочка не более 30 аминокислот — нейропептид (Бонь. Е.И., 2021).

В настоящее время выявлены системные плеiotропные протективные эффекты эритропоэтина (ЕРО) в условиях его повышенной продукции. Согласно данным литературы ЕРО увеличивает длительность функционирования эндотелиальных клеток при кислородном голодании, обладает антиапоптотическим эффектом по отношению к клеткам эндотелия, вызывает активацию эндотелиальной NO-синтетазы и предотвращает ангиоспазм, уменьшает NO-токсичность и обладает прямым антиоксидантным эффектом. Реализация цитопротекторной активности ЭПО опосредуется связыванием с гетеродимерным рецептором EPOR- β CR, что, в свою очередь, приводит к снижению чувствительности клеток к гипоксии и активации антиапоптотических сигнальных путей. Ряд исследователей показали, что гибридные варианты ЕРО, модифицированные по аминокислотным остаткам высоко и низкоаффинных сайтов связывания с ЕРО-рецепторами, сохраняют цитопротекторные свойства (Артюшкова Е.Б., 2008).

Прогресс в определении механизмов нейродегенерации способствует выявлению новых фармакологических мишеней для разработки эффективных средств патогенетической фармакотерапии и одним из перспективных направлений является изучение производных эритропоэтина, не стимулирующих эритропоэз, но способных инициировать цитопротекцию. (Калинина Т.В. и др., 2015).

Со времени открытия фактора роста нервов (NGF) в 1952 г. убедительно доказана его роль в процессах роста, дифференциации и выживания нейронов (Levi - Montalcini R., 1987). NGF взаимодействует с

тирозинкиназным (TrkA) рецептором, опосредующим каскад биохимических реакций, приводящих к фосфорилированию внутриклеточных белков-мишеней, активации экспрессионных факторов и специфическим изменениям экспрессии генов. Имеются многочисленные экспериментальные данные, определяющие фармакотерапевтический потенциал NGF для нейродегенеративных заболеваний, воспаления, некоторых злокачественных новообразований и др. (Apfel S.C., 2002; Williams B.J., 2006). Известны и ограничения для прямого использования NGF из-за его биodeградации, низкой биодоступности при системном введении, а также наличия побочных действий, связанных с плеiotропностью белка (Apfel S.C., 2002). В связи с этим была крайне актуальна разработка системно-активных низкомолекулярных аналогов NGF, избирательно воспроизводящих его эффекты. NGF представляет собой гомодимерный белок с экспонированными наружу шпилькообразными структурами – петлями, которые, как полагают, участвуют во взаимодействии с рецептором (Peleshok J., Saragovi H.U., 2006). Гидрофильные петли 1 и 4 NGF были использованы для дизайна низкомолекулярных миметиков. В связи с этим представляет интерес миметик четвертой петли, сконструированный в НИИ фармакологии РАМН на основе структуры ее бета-изгиба Asp93–Glu94–Lys95–Gln96, который наиболее выдвинут наружу и поэтому может играть основную роль при взаимодействии NGF с рецептором. При этом был сохранен центральный дипептидный фрагмент Glu94–Lys95, который по геометрическим данным должен наиболее глубоко проникать в зону связывания рецептора и наиболее полно распознаваться им. Периферийный Asp93 был заменен его биоизостером, остатком янтарной кислоты. Аминокислотный остаток Gln96 представлен амидной группой. Цели этих двух замен – стабилизация конформации бета-изгиба, увеличение устойчивости соединения к действию пептидаз, а также удешевление синтеза. Таким образом, на основе структуры бета-изгиба четвертой петли NGF нами был сконструирован замещенный

дипептид, в котором два миметика бета-изгиба связаны через гексаметилендиаминовый спейсер (ГК-2 h).

Результаты исследования показали показали антиамнестическую и нейропротективную активность гибридных белков ЕРО как при монотерапии, так и в комбинации с ГК-2 h. Нейропротекторный эффект был выражен в снижении объема ишемического повреждения, оцененном морфометрически и при помощи МРТ и сохранением воспроизведения памятного следа в тесте УРПИ. Наиболее выраженный антиамнестический, а также нейропротекторный эффекты отмечался в рамках комбинированной терапии при совместном применении прооизводных эритропоэтина и дипептидного миметика ГК-2h. Наличие в одном нейроне двух и более нейропептидов и/или нейромедиаторов создает возможности по взаимодействию их друг с другом: усиление или ослабление постсинаптического действия каждого, усиление или ослабление процессов высвобождения и захвата (Бонь, 2021).

Особенностью структуры нейропептидов является наличие нескольких лигандных групп связывания, предназначенных для разных клеточных рецепторов. Это одно из «молекулярных объяснений» присущей им полифункциональности. Физиологическая активность нейропептидов во много раз может превышать аналогичное действие непептидных соединений. В зависимости от места их высвобождения нейропептиды могут осуществлять медиаторную функцию (передачу сигнала от одной клетки к другой), модулировать реактивность определенных групп нейронов, стимулировать или тормозить выброс гормонов, регулировать тканевой метаболизм или выполнять функцию эффекторных физиологически активных агентов (вазомоторная, Na^+ -уретическая и другие виды регуляции). Известно, что нейропептиды способны регулировать активность про- и противовоспалительных цитокинов через модуляцию активности их рецепторов. При этом восстановление нормального баланса цитокинов происходит более эффективно, чем при воздействии на отдельные

цитокиновые системы. Как правило, «цитокиновые» эффекты нейропептидов сопровождаются их влиянием на генерацию оксида азота и другие оксидантные процессы. Многие нейропептиды проявляют выраженные нейротрофические ростовые свойства. С учетом того, что нейропептиды легко проникают через ГЭБ (в отличие от полипептидных цепей факторов роста), трудно переоценить их потенциальную терапевтическую значимость.

Отечественный нейропептид Семакс, созданный на основе фрагмента АКТГ₄₋₇, представляет собой гептапептид (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), лишенный гормональной активности. Семакс — первый российский ноотропный препарат неистощающего типа, имеющий ряд важных преимуществ перед известными аналогами: полное отсутствие токсических и побочных влияний, гормональной активности, увеличение продолжительности действия более чем в 24 раза по сравнению с природным аналогом, возможность интраназального введения с реальным проникновением в мозг. В экспериментах на культуре ткани продемонстрировано мощное трофотропное действие препарата на нейроны холинергической группы, а также достоверное повышение синтеза нейротрофических факторов (NGF и BDNF).

В то же время участие некоторых нейротрансмиттерных и регуляторных систем мозга в защитных и регенеративных процессах, способствующих восстановлению способности к обучению недостаточно изучена. Одна из таких регуляторных систем возможно связана с меланокортинами - семейством пептидов, образующихся на проопиомеланокортина. Известно, что меланокортины играют важную роль в развитии, регенерации и функционировании головного мозга (de Wied D., 1982). Помимо α -меланоцит-стимулирующего гормона (α -МСТ) АКТГ сильными поведенческими эффектами обладают также их более короткие фрагменты, наиболее изученными из которых являются АКТГ (1-24), АКТГ (4-10). АКТГ (4-9) и АКТГ (4-7) (de Wied D., Jolles J., 1982). Эти пептиды влияют на память, мотивацию и концентрацию внимания (de Wied D., 1997).

Для экспериментальных исследований меланокортинов *in vivo* часто используют их синтетические аналоги, обладающие более высокой устойчивостью к действию протеолитических ферментов. Пептид - Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (Семакс) один из них. Его N- последовательность идентична фрагменту АКТГ (4-7). Семакс в отличие от α -МСТ п АКТГ, не проявляет меланоцит-стимулирующей активности, но вместе с тем обладает когнитивным действием, причем более пролонгированным по сравнению с природными фрагментами АКТГ (Пономарева-Степная М., 1984). Результаты ряда экспериментальных исследований показали также, что Семакс обладает также выраженным нейропротективным действием при гипоксии, ишемии головного мозга и нейротоксическом действии 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (Каплан А.Я. и др., 1992; Романова Г.А. и др., 2006; Levitskaya N.G., 2004).

В исследовании показано, что двустороннее ишемическое повреждение префронтальной области коры мозга приводит к ухудшению пространственного обучения в водном лабиринте Морриса через 20-24 суток после операции, а курсовое интраназальное введение синтетического аналога АКТГ₄₋₇ в течение первых шести дней после фототромбоза приводит к уменьшению времени поиска платформы и к сокращению длины пути до ее достижения, компенсируя мнестический дефицит, вызванный ишемией. Полученные данные указывают на наличие антиамнестического действия Семакс на отдаленных сроках (20-24 дня) после двустороннего ишемического повреждения префронтальной области коры мозга.

Известно, что объем и степень поражения головного мозга при ишемии, а также восстановительный потенциал ишемизированной ткани мозга зависят от функциональной активности митохондрий. Описаны разные патогенетически обоснованные подходы, направленные на поддержание электронтранспортной, энергосинтезирующей и Ca^{2+} -аккумулирующей функций митохондрий при ишемии (Lukyanova L.D., Kirova Y.I. 2015;

Farshbaf J.M., Kiani-Esfahani A., 2018). Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) митохондрий является уникальным ферментом, устойчивым к ингибирующему действию многих дыхательных ядов и активных форм кислорода. Активация сукцинатдегидрогеназы в условиях гипоксии, ишемии, травмы, интоксикации и воспаления, позволяет рассматривать ее как фермент поддержания механизмов митохондриальной энергопродукции в патофизиологических условиях. Активность СДГ является неотъемлемым элементом в системе молекулярно-клеточных механизмов толерантности к гипоксии/ишемии (Lukyanova L.D., Kirova Y.I. 2015; Farshbaf J.M., Kiani-Esfahani A., 2018).

Представляло интерес влияние Семакса при однократном и курсовом интраназальном введении на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий в остром периоде при двустороннем фотохимическом ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс. Применение 4-кратной суточной схемы введения Семакса с 6-часовыми интервалами позволило получить устойчивый эффект нормализации активности СДГ в перифокальной зоне префронтальной коры. Исследование позволило получить устойчивый эффект нормализации активности СДГ в перифокальной зоне префронтальной коры при 4-кратной схеме введения Семакса с 6-часовыми интервалами. Полученный результат позволяет расценивать определение активности СДГ митохондрий перифокальной зоны как перспективный метод оценки тяжести ишемического повреждения мозга и эффективности применяемой нейропротективной терапии.

Проблема повышения устойчивости головного мозга к функциональным нагрузкам, гипоксии, ишемии, травмам, интоксикациям, возрастной нейродегенерации сохраняет высокую медицинскую и социально-экономическую значимость. В последние годы в качестве перспективного нейропротекторного направления разрабатываются митохондриотропные фармакологические и немедикаментозные подходы, направленные на индукцию митохондриогенеза, поддержание Ca^{2+} -

аккумулирующей функции митохондрий, снижение проницаемости неспецифической поры (mitochondrial permeability transition pore, mPTP). Несмотря на широкие исследования в этой области арсенал фармакологических активаторов биогенеза митохондрий, эффективность которых подтверждена экспериментально и клинически, ограничивается лишь несколькими препаратами (ресвератрол; безафибрат; AICAR, 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибо-нуклеозид). В связи с чем, поиск и создание эффективных и безопасных нейроспецифических индукторов церебрального митохондриогенеза являются актуальной задачей экспериментальной и клинической нейронауки.

В качестве потенциального активатора биогенеза митохондрий был исследован сукцинатсодержащий препарат Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат). Известно, что сукцинат реализует сигнальную функцию через активацию сукцинатного рецептора SUCNR1/GPR91. При этом инициируются внутриклеточные сигнальные пути, активирующие и индуцирующие ключевой регулятор митохондриогенеза и ангиогенеза у млекопитающих PGC1 α (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α).

Исследования сукцинатной сигнализации в нервной ткани показали, что SUCNR1 выявляется в нейронах, астроцитах, микроглии, в условиях физиологической нормы и при ишемии, на этапе эмбрионального и постнатального развития, имеет критическое значение для васкуляризации и ангиогенеза мозга (Hamel D. et al. 2014).

Активация сукцинатного рецептора в нейронах инициирует G α q-белок-сопряженные сигнальные пути (кальциевый сигнальный каскад; PLC, IP3/Ca²⁺/CaMK, DAG/PKC, PKC/ERK1/2/COX-2/PGE2, Ca²⁺/CaM/NOS/NO), причастные не только к ангиогенезу, но и к индукции биогенеза митохондрий (He W., 2004, Hamel D., 2014). Однако исследования роли сукцинатной сигнализации в регуляции церебрального митохондриогенеза отсутствуют. Ангиогенез и митохондриогенез составляют критически

значимые механизмы повышения толерантности мозга к гипоксии/ишемии, имеющие единые регуляторные звенья. Таким общим регуляторным звеном является транскрипционный коактиватор PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha; коактиватор 1 α γ -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом). PGC-1 α интегрирует метаболические и нейрогормональные сигналы, служит детектором энергетического состояния клетки и осуществляет тонкую настройку митохондриального аппарата клеток к текущим энергетическим потребностям. PGC-1 α является коактиватором транскрипционных факторов (NRF, PPAR, ERR), активирующих экспрессию генов ферментов дыхательной цепи митохондрий, β -окисления высших жирных кислот, цикла трикарбоновых кислот, репликации и транскрипции митохондриальной ДНК, ангиогенных факторов и антиоксидантных ферментов, т.е. обеспечивает усиление тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования без ущерба от окислительного повреждения. Несмотря на перспективы, связанные с PGC-1 α и биогенезом митохондрий, существует проблема малочисленности фармакологических препаратов, способных стимулировать активность и экспрессию PGC-1 α (Uittenbogaard M., Chiamarello A., 2014).

В проведенном исследовании при курсовом применении Мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг было выявлено дозозависимое увеличение экспрессии SUCNR1 и сопряженная индукция VEGF. Ранее было показано, что индукция VEGF служит маркером активации SUCNR1. В рамках исследования впервые установлено, что сукцинатная сигнализация сопровождается в коре головного мозга не только увеличением экспрессии SUCNR1 и VEGF, но также индукцией ключевого регулятора митохондриогенеза млекопитающих PGC-1 α и маркеров биогенеза митохондрий - NRF1, TFAM, каталитических субъединиц дыхательной цепи и АТФ-синтазы. Впервые показано, что ключевой механизм повышения толерантности мозга к гипоксии/ишемии биогенез митохондрий является сукцинат/SUCNR1-опосредуемым. Индукция

PGC-1 α , продемонстрированная в работе, расширяет представления о механизмах плеiotропной нейропротекторной активности Мексидола.

В исследовании впервые выявлена вовлеченность сукцинатсодержащего препарата Мексидол в механизмы индукции церебрального митохондриогенеза, что существенно расширяет сложившиеся представления о его терапевтическом потенциале и позволяет осуществлять эффективную коррекцию патологической репрессии митохондрий мозга.

Вопрос о механизмах подавления экспрессии **PGC-1 α** при ишемии/гипоксии активно обсуждается в литературе. Сообщается о супрессии PGC-1 α при хронической церебральной гипоперфузии (Du J., 2013; Nan B., 2020). Центральная роль в отрицательной регуляции PGC-1 α отводится гипоксическому фактору транскрипции HIF-1 α (Schönenberger M., 2015). Известно, что HIF-1 α является ключевым фактором формирования генно-опосредованных механизмов адаптации в условиях дефицита кислорода, включая ангиогенез, гликолитический путь окисления, эритропоэз (Shi H., 2009). HIF-1 α также является ключевым фактором подавления биогенеза митохондрий и экспрессии PGC-1 α через механизмы отрицательной регуляции транскрипционного фактора MYC и MYC-зависимых транскрипционных факторов (PPARs, ERRs), активирующих ген PGC-1 α (Morrish F., 2014; Zhang H., 2007; Villena J., 2008). Таким образом, условия продолжительной ишемии/гипоксии вызывают HIF-1 α -зависимую негативную регуляцию PGC-1 α и PGC-1 α -сопряженных процессов (биогенез митохондрий). В этой связи, потенциальные нейропротекторные препараты должны обладать вазодилататорным, ангиогенным, ангиопротекторным эффектами, способствовать усилению перфузии/оксигенации ишемизированного участка мозга и ограничению активности HIF-1 α .

В эксперименте на модели фотохимического тромбоза была выявлена краткосрочная выраженная активация PGC-1 α , о которой свидетельствовало значительное увеличение уровня экспрессии PGC-1 α -зависимых белков: NRF1, TFAM, каталитических субъединиц ферментов субстратного участка дыхательной цепи (NDUFV2, SDHA), VEGF, SYP. Максимальная индукция белков-маркеров активности PGC-1 α отмечалась через сутки после фототромбоза, после чего интенсивность индукции PGC-1 α -зависимых белков снижалась, а к 7-м суткам практически исчезала.

Снижение активности PGC-1 α , контролирующего противовоспалительные факторы транскрипции (глюкокортикоидные рецепторы, рецепторы тиреоидных гормонов, PPARs), сопровождалось развитием острой воспалительной реакции на 3-и и 7-е сутки постишемического периода: была выявлена отчетливая тенденция нарастающей в ходе постишемического периода инфильтрации очага инсульта и пенумбры воспалительными иммунными клетками (макрофаги, нейтрофилы), цитотоксическая активность которых может быть причастна к наблюдаемой в течение 21 дня постинсультного периода прогрессивной гибели нейронов (механизм вторичной воспалительной гибели нейронов).

Введение синтетического аналога АКТГ₄₋₇ и непептидного ЭМПП сукцината через 2 ч после фототромбоза и на протяжении 7 дней сопровождалось уменьшением размеров очага инсульта и протяженности пенумбры, сохранением количества нейронов в пенумбре на уровне контроля, поддержанием уровня экспрессии PGC-1 α в индивидуальных нейронах и стимуляцией ядерной транслокации (активации) PGC-1 α .

Способность препаратов оказывать нейротрофическое действие может опосредоваться активацией специфических рецепторов: сукцинатного рецептора SUCNR1 для Мексидола и семейства меланокортиновых рецепторов MCRs для Семакса (Hamel D., 2014; Gallo-Payet N., 2016; Lisak R., 2017; Sapieha P., 2008). Стимуляция рецепторов сопровождается активацией G-белков и внутриклеточных сигнальных каскадов, ключевыми

участниками которых являются киназы (CaMK, MAPK, PI3K), известные своими множественными нейропротекторными эффектами, в частности, активацией транскрипционного фактора CREB, контролирующего экспрессию противовоспалительных (IL-10, TGF- β), антиапоптотических (bcl-2), нейротрофических (BDNF), антиоксидантных (SOD2) факторов, а также транскрипционного коактиватора PGC-1 α (Greer P., 2008; Kitagawa K., 2007; Lonze B., 2002). Действительно, применяя иммуногистохимическое окрашивание срезов префронтальной коры, нами был показан высокий уровень нейрональной экспрессии PGC-1 α в группах животных с ишемией, получивших аналог АКТГ₄₋₇ и ЭМГП сукцинат.

Курсовое применение препаратов АКТГ₄₋₇ и ЭМГП сукцината способствовало не только индукции, но и активации PGC-1 α . Применение АКТГ₄₋₇ и ЭМГП сукцината, в особенности ЭМГП сукцината, продлевало период активации PGC-1 α , что может быть связано с рецептор-опосредованной (SUCNR1, MCRs) инициацией в нейронах кальциевых сигнальных каскадов (Hamel D., 2014; Gallo-Payet N., 2016; Lisak R., 2017; Sapieha P., 2008).

Курсовое введение АКТГ₄₋₇ и ЭМГП сукцината оказывали иммуносупрессорное действие, ограничивая инфильтрацию пенумбры воспалительными клетками, динамику и тяжесть воспалительной реакции. Наиболее выраженный эффект оказывал ЭМГП сукцинат, введение которого снижало количество макрофагов и нейтрофилов в пенумбре на протяжении 21-дневного постишемического периода в 2 и 3 раза, соответственно. Модуляция воспалительного процесса исследуемыми препаратами может осуществляться через взаимодействие со специфическими рецепторами (SUCNR1 для ЭМГП сукцината, MCRs для АКТГ₄₋₇), экспрессируемыми микроглией, макрофагами и лимфоцитами. Ранее были показаны прямые рецептор-опосредованные противовоспалительные эффекты АКТГ и сукцината на иммунные клетки, связанные с блокадой провоспалительной поляризации (Diepen J., 2017; Gallo-Payet N., 2016; Lisak R., 2017).

Поддержание противовоспалительного (репаративного) М2-фенотипа макрофагов и микроглии имеет принципиальное значение для индукции PGC-1 α в нейронах пенумбры, поскольку именно М2-фенотип является главным источником нейротрофинов – положительных модуляторов PGC-1 α (Cheng N., 2012).

На основании результатов исследования можно заключить, что сукцинатсодержащий препарат Мексидол обладает выраженным потенциалом к индукции и активации PGC-1 α в зоне сниженной перфузии, примыкающей к очагу инфаркта (зона ишемической полутени). Сукцинат может быть отнесен к группе соединений DAMPs, высвобождаемых поврежденными клетками и клетками, переживающими экстремальные условия ишемии/гипоксии. Сукцинат – энергетический субстрат, окисляемый II комплексом дыхательной цепи митохондрий. В условиях гипоксии сукцинат активно продуцируется митохондриями в результате восстановительного обращения цикла Кребса, что способствует поддержанию пула окисленного НАД⁺, НАД⁺-зависимого гликолиза и энергопродуцирующей функции митохондрий (Ariza A., 2012). В 2004 г, когда был идентифицирован высокоспецифичный сукцинатный рецептор SUCNR1/GPR91, стало очевидно, что сукцинат играет регуляторную сигнальную роль в формировании адаптивных механизмов толерантности к ишемии/гипоксии на клеточном, тканевом и системном уровне (He H., 2004; Hamel D., 2014; Toma I., 2008; Lukyanova L., 2015). Сигнальная система сукцинат/SUCNR1 активирует процессы ангиогенеза в ишемизированном мозге, оказывает вазодилататорные эффекты (Hamel D., 2014). В недавних исследованиях было показано, что сукцинат интенсивно продуцируется активированными макрофагами (Diskin C., 2018).

Таким образом, сукцинат является важной сигнальной адаптогенной молекулой, продукция которой существенно увеличивается в условиях ишемии/гипоксии, в отличие от сигнальных молекул пептидной природы, синтез которых блокируется условиями ишемии/гипоксии (De la Vega M.,

2001; Petegnief V., 2008). Ишемическая супрессия трансляционных процессов сопровождается подавлением экспрессии не только пептидных нейрогормонов и нейротрансмиттеров, но и их рецепторов (Hermann D., 2001; De la Vega M., 2001; Medvedeva E.V., 2014). В связи с чем, приоритетное значение в зоне пенумбры имеют сигнальные молекулы непептидной природы, реализующие адаптогенные эффекты через активацию конституционно-экспрессируемых рецепторов.

В проведенном исследовании показано, что ишемия сопровождается увеличением уровня SUCNR1 в пенумбре. Введение Мексидола увеличивает выраженность и продолжительность экспрессии SUCNR1. Ранее было показано, что курсовое в/б введение Мексидола в дозе 100 мг/кг увеличивает экспрессию SUCNR1 в коре головного мозга здоровых молодых и стареющих крыс, причем это происходит сопряженно с увеличением экспрессии и активации PGC-1 α (Кирова Ю.И. и др., 2020). Введение 6-этил-2-метил-3-гидроксипиридина (в комплексе с сукцинатом составляет структуру Мексидола) не повлияло на уровень SUCNR1, PGC-1 α и белков-маркеров активности PGC-1 α , что свидетельствует об определяющей роли сукцината в PGC-1 α -модулирующей активности Мексидола (Кирова Ю.И., 2020). Индукция и активация транскрипционного коактиватора PGC-1 α может реализовываться по Ca⁺²-, CaMK⁻, PGE²-, NO-зависимым механизмам, известным для церебральной сукцинат/SUCNR1 сигнализации (Hamel, 2014; Sapieha, 2008). Важно подчеркнуть, что индукция PGC-1 α может быть связана не только с активацией SUCNR1 в нейронах. Этот эффект может реализовываться опосредованно, через механизм SUCNR1-зависимого увеличения церебральной секреции катехоламинов, задействованных в индукции PGC-1 α , а также в результате секреции нейротрофинов противовоспалительным (репаративным) фенотипом макрофагов/микроглии, экспрессирующим SUCNR1 (Diepen J., 2017; Khunderyakova N.V., 2008). Эти механизмы нуждаются в дополнительном изучении.

Проведенное исследование впервые выявило единую молекулярно-клеточную мишень – транскрипционный коактиватор PGC-1 α - реализующую множественные рецептор-опосредованные нейропротекторные эффекты эндогенных и синтетических сигнальных молекул. Впервые показано, что мультитаргетное защитное действие препаратов ЭМГП сукцината (Мексидол) и аналога АКГГ₄₋₇ (Семакс) реализуется через механизм индукции и активации транскрипционного коактиватора PGC-1 α , проявляющего плейоторопное потенцирующее влияние на выживаемость и функциональную активность нейронов.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных нами данных позволяет сделать следующее общее заключение.

Двустороннее очаговое фотохимическое повреждение префронтальной коры крыс можно рассматривать как экспериментальную модель, позволяющую исследовать механизмы избирательного нарушения когнитивных функций мозга.

Оценка действия препаратов, относящихся к разным фармакологическим группам выявила нормализующее влияние протестированных соединений на нейрохимические и морфофункциональные нарушения при экспериментальном ишемическом повреждении коры головного мозга, что позволяет рассматривать антитела к глутамату, производные эритропоэтина, дипептидный миметик фактора роста нервов, аналог аденокортикотропного гормона (4-7), этилметилпиримедина сукцината как перспективные нейропротекторы, которые в дальнейшем могут найти свое место в оптимизации стратегий патогенетической терапии ишемии как моно- препараты, так и в составе комплексной терапии.

Ишемический инсульт приводит к снижению уровня транскрипционного коактиватора PGC-1 α - ключевого регулятора процессов биогенеза

митохондрий, ангио- и синаптогенеза в коре головного мозга в раннем постишемическом периоде. Уровень экспрессии белков-маркеров активности PGC-1 α повышается в первые сутки после ишемии и снижается в более поздние сроки (3-21-е сутки), что указывает на кратковременную активацию PGC-1 α в острейшем периоде инсульта с дальнейшим стойким снижением активности транскрипционного активатора.

Массивная инфильтрация перифокальной области лейкоцитами крови, нарастающие микроциркуляторные нарушения и прогрессия пенумбры свидетельствуют о развитии острой воспалительной реакции и дисфункции PGC-1 α , контролирующего механизмы противовоспалительной поляризации иммунцитов в области очага.

Стимуляция экспрессии и активности PGC-1 α посредством рецептор-опосредованной сукцинатной и АКТГ- сигнализации сопровождается активацией процессов митохондриогенеза, ангио-, синаптогенеза и торможением воспалительной реакции. Применение в постишемическом периоде соединений пептидной и непептидной природы показало высокий потенциал непептидных соединений в стимуляции PGC-1 α , коррекции метаболических нарушений.

Проведенное исследование позволяет заключить, что эффективная индукция/активация PGC-1 α в нейронах ишемической пенумбры может осуществляться при совокупном проявлении фармакологическими агентами противовоспалительного, ангиопротекторного, нейротрофического эффектов, реализуемых через специфические рецепторы (в исследовании SUCNR1, MCRs), способствующих усилению перфузии/оксигенации ишемизированного участка мозга, ограничению активности HIF-1 α и провоспалительной поляризации иммунных клеток и микроглии. Этими свойствами характеризуется сигнальная система сукцинат/SUCNR1 и, как показало проведенное исследование, сукцинатсодержащие препараты могут представлять исключительную по значимости группу положительных модуляторов PGC-1 α .

Выводы

1. В развитии постишемического повреждения ткани мозга выявлен единый триггерный механизм дизрегуляции внутриклеточных нейропротекторных систем – устойчивая супрессия и деактивация транскрипционного коактиватора PGC-1 α – ключевого координатора биогенеза митохондрий и митохондриальной динамики, антиоксидантных систем, ангио- и синаптогенеза, противовоспалительной трансформации иммунцитов.
2. Для оценки активности PGC-1 α наиболее адекватным специфическим подходом является определение экспрессии PGC-1 α -зависимых белков-маркеров митохондриогенеза: транскрипционных факторов TFAM, NRF1, каталитических субъединиц субстратного участка дыхательной цепи NDUFV2, SDHA.
3. Деактивация PGC-1 α сопровождается развитием острой воспалительной реакции, массивированной инфильтрации пенумбры макрофагами, поражением микрососудистого русла, вторичной ишемизацией, прогрессией перифокальной зоны и вторичной постишемической гибелью нейронов.
4. Фармакологические препараты (аналог АКТГ₄₋₇ и ЭМГП сукцинат) с клинически и экспериментально подтвержденным плеiotропным нейропротекторным действием реализуют эффекты через положительную модуляцию транскрипционного коактиватора PGC-1 α .
5. Положительная модуляция PGC-1 α с помощью миметика АКТГ₄₋₇ и ЭМГП сукцината сопровождается активацией внутриклеточных нейропротекторных систем (биогенез митохондрий), торможением воспалительной реакции (противовоспалительная поляризация иммунцитов) и уменьшением когнитивного и сенсомоторного дефицита.
6. Эффективная индукция/активация PGC-1 α в периинфарктной ткани может осуществляться через стимуляцию специфических рецепторов (в исследовании MCRs, SUCNR1), экспрессируемых всеми клеточными

популяциями паренхимы мозга (нейронами, астроцитами, микроглиоцитами, олигодендроцитами).

7. Сукцинатный рецептор SUCNR1 характеризуется уникальной ишемической сверхэкспрессией, что предопределяет высокий потенциал сукцинатсодержащих препаратов (в исследовании ЭМГП сукцинат) как положительных модуляторов PGC-1 α в раннем постишемическом периоде.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АТ – ГЛУ – антитела к глутамату

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК - активные формы кислорода

ГАМК – гамма-амино-масляная кислота

ГК-2h- гексаметилендиамида бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина), димерного дипептидного миметика человеческого NRF

ГЛУ – глутамат

ГПО - глутатионпероксидаза

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДА - дофамин

ДОФУК - 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота

ДОФУК/ДА - 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота/дофамин

ИР - иммунореактивность

КГД - кислород-глюкозная депривация

МД - митохондриальная деполяризация

МРТ – магнитно-резонансная томография

мтДНК – митохондриальная ДНК

НАД+ - никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма

НВЕ - нейроваскулярная единица

нкРНК - некодирующими РНК

ОКД - отсроченная кальциевая дисрегуляция

ОСМА - окклюзия средней мозговой артерии

ПОЛ - перекисное окисление липидов

ПФК – префронтальная кора головного мозга

СОД - супероксиддисмутаза

ТР - тиоредоксинредуктаза

ТФФ – триметилфосфоний

ХГ – хлоралгидрат

ЦВЗ - цереброваскулярные заболевания

цГМФ (NO-сигнальный путь)

ЦНС – центральная нервная система

4-HNE - 4-hydroxynonenal; 4-гидроксиноненалем

5-ОТ - 5-гидрокситриптамин

5-ОИУК - 5-оксииндолуксусная кислота

ABCA1 - member 1 of human transporter sub-family ABCA; представитель суперсемейства АТФ-связывающих кассетных транспортеров

ADR-1 - рецептор адипонектина -1

AICAR - 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide; рибонуклеозид-5-аминоимидазол-4-карбоксамид

AIF - apoptosis-inducing factor; проапоптотический фактор

AMP – adenosine monophosphate; аденозинмонофосфат

АТР5А - ATP synthase alpha chain; АТФ-синтазы альфа цепь; каталитическая субъединица V ферментного комплекса внутренней мембраны митохондрий

BDNF - brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга

Ca²⁺ - ионы кальция

САМК - Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase class of enzymes, Ca²⁺/кальмодулинзависимые протеинкиназы.

CaМК - кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа

CAMs - cell adhesion molecule; молекулы клеточной адгезии

сGMP - циклический гуанозинмонофосфат

COX2 - cytochrome c oxidase subunit II; цитохром с оксидазы II субъединица; каталитическая субъединица IV комплекса дыхательных ферментов

CREB - response element-binding protein; транскрипционный фактор

CREB-TF (CREB, cAMP response element-binding protein); фактор транскрипции

CypD - циклофилин D

cyt b - cytochrome b; цитохром b; фермент III комплекса дыхательных ферментов

DAMP - damage-associated molecular pattern; молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями

eNOS - третья изоформа NO - синтазы, обнаруженная в эндотелиальных клетках

ERC - extracellular signal-regulated kinase, внеклеточная сигнал-регулируемая киназа

ERR α - estrogen-related receptor; рецептор, связанный с эстрогеном

GABAR – рецепторы ГАМК

GBD - Global Burden Diseases

GDNF - glial cell line-derived neurotrophic factor; фактор роста глии

GFAP - glial fibrillary acidic protein; кислого глиального фибриллярного белка

GluN-рецепторы — ионотропные глутаматные рецепторы

HIF-1 α — hypoxia-inducible factor 1-alpha; фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа

HMGB1 - high-mobility group protein B1

HT22 - культура мышинных нейронов гиппокампа

IL– интерлейкин

IRF - регуляторные факторы интерферона

JNK - Jun N-terminal kinases, N-концевая киназа

mAb - моноклональные антитела

MAPK - mitogen-activated protein kinase; митоген-активируемая протеинкиназа

MMPs - matrix metalloproteinases; матриксные металлопротеиназы

MSRs - нейрональный меланокортиновый рецептор

MYC - протоонкогенный белок, транскрипционный фактор

MCRs - melanocortin receptor; нейрональный меланокортиновый рецептор

NDUFV2 - NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2; НАДН дегидрогеназы флавопротеин 2; каталитическая субъединица I комплекса дыхательных ферментов

NeuN – neuronal nuclear protein; нейрональный ядерный белок

NF-B - ядерный фактор-B

NGF - фактора роста нервов

Notch - трансмембранные рецепторы

NRF – nuclear respiratory factor; ядерный респираторный фактор

ONOO - пероксинитрит

PBS - phosphate buffered saline, физиологический раствор с фосфатным буфером

PDGFR β - a receptor for members of the platelet-derived growth factors; рецептор семейства тромбоцитарного фактора роста

PGC-1 α – peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; коактиватор 1 альфа гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом; транскрипционный коактиватор

PGE2- prostaglandin E2, простагландин E2

PPAR – proliferator peroxisome activated receptor; рецептор, активируемый пролифератором пероксисом; транскрипционный фактор

SDHA - a flavochrome subunit of succinate dehydrogenase; флавиновая субъединица A сукцинатдегидрогеназы; каталитическая субъединица II комплекса дыхательных ферментов

SOD - superoxide dismutase 2; супероксиддисмутаза 2

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 A

TGF β 1 – трансформирующий фактор роста β 1

TLR - toll-подобные рецепторы

tPA - плазминоген тканевого типа

TR – тиреоидный гормон

T_{reg} - регуляторные T- клетки

VDAC - voltage-dependent anion channel; потенциалзависимый анионный канал наружной мембраны

VEC – VE-cadherin; vascular endothelial cadherin; VE-кадгерин

VEGF – vascular endothelial growth factor; фактор роста эндотелия сосудов

V_{mit} – трансмембранный потенциал митохондрий

XO - ксантиноксидаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артюшкова Е.Б., Пашков Д.В., Покровский М.В. и др.
Возможности фармакологической коррекции хронической ишемии конечности

в эксперименте // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71, № 3. – С. 23–25.

2. Ашмарин И.П., Стукалов П.В., Нейрохимия. М., Изд-во Инст. Биомед. Химии РАМН, 1966. – С. 87-117.

3. Ашмарин, И.П. Нейрохимия / И.П. Ашмарин, П.В. Стукалов. - М., Изд-во института биомедицинской химии, 1996. - 469 с.

4. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М., Медицина; 1989.

5. Бонь Е.И. Характеристика медиаторов и модуляторов, их биологическая роль в функционировании нервной системы // Вестник НовГУ. Сер.: Медицинские науки. - 2021. - №1 (122). - С.6-14. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1\(122\).6-14](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1(122).6-14)

6. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. Р.// Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М., "Высшая школа", 1991. – 399 с.

7. Верещагин Н.В., Пирадов М.А., Суслина З.А. Инсульт: принципы диагностики, лечения и профилактики. М., Интермедика, 2002. - 208 с.

8. Воронина Т.А. Мексидол. Основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия // Поликлиника. - 2009. - № 5. - С. 32-36.

9. Гаврилова Н.А., Черемных А.М., Бобренева Р.А., Аскерова В.А., Калинина Т.И., Булушова Н.В., Честухина Г.Г., Юрин В.Л. Гемопоезическая активность и фармакокинетика ЕРО-Fc, ЕРО-Fcneo и Alb-ЕРО гибридных белков - производных эритропоэтина человека // Биотехнология. – 2012. – Т. 5. – С. 38–49.

10. Григорьева М.Е., Ляпина Л.А. Противосвертывающие и антитромбоцитарные эффекты препарата «Семакс» в условиях острого и хронического стресса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2010. - Т. 149. - № 1. - С. 49-52.

11. Гудашева Т.А., Романова Г.А., Шакова Ф.М., Котельникова С.О., Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Середенин С.Б. Нейропротекторное и

антиамнестическое действие дипептидного миметика человеческого фактора роста ГК-2 нервов при экспериментальном инфаркте коры головного мозга. Журнал экспериментальной и клинической фармакологии // 2012. – Т. 75, №10, С. 12-15.

12. Гусев Е.И., Крыжановский Г.Н. (ред.). Дизрегуляторная патология нервной системы. М., Медицинское информационное агентство. - 2009. - 510 с.

13. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. - М., 2001. – 328 с.

14. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мартынов М.Ю., Камчатное П.Р. Церебральный инсульт: проблемы и решения // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2006. - №4 (51). - Р. 28-36

15. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Платонова И.А. Терапия ишемического инсульта // Consilium Medicum. - 2003. - №8. - С. 18-25.

16. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В. Эпидемиология инсульта в России // Журнал неврологии и психиатрии. – 2003. – Т. 8. – С. 4-9.

17. 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.

18. Евсеев В. А. Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии. М.: Изд. РАМН. - 2007. - 144с.

19. 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.

20. Калинина Т.И., Юрин В.Л. Гибридный белок на основе рекомбинантного эритропоэтина человека, обладающий пролонгированным

действием (варианты), и способ его получения. Изобретение МПК: C07K14/505 C12N15/62.

21. 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.
<https://doi.org/10.17116/jnevro202012001162>

22. Клочихина О.А., Стаховская Л.В. Анализ эпидемиологических показателей 45 инсульта по данным территориально-популяционных регистров 2009-2012 гг. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2014. – Т. 114. № 6-1. - С.63-69

23. Кондрашова М.Н. Гормоноподобное действие янтарной кислоты. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2002. - № 1. - С. 7-12.

24. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Байса А.Е., Власов Т.Д. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, №2. – С. 217-219

25. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Власов Т.Д. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии // Морфология. – 2012. – Т. 141, №2. – С.28-32.

26. Крыжановский Г.Н. Свободнорадикальное окисление // Дизрегуляторная патология. Руководство для врачей и биологов / ред. Крыжановского Г.Н. – М., Медицина. - 2002. – С.29-30.

27. Пирадов М.А., Максимова М.Ю., Танашян М.М. Инсульт, пошаговая инструкция. Руководство для врачей М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. - 272 с.

28. Поварнина П. Ю., Волкова А. А., Гудашева Т. А., Середенин С. Б. Сравнение фармакологических эффектов димерного дипептидного миметика

фактора роста нервов ГК-2 и Мексидола на модели ишемического инсульта у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2017. - Т. 164, № 8. - С. 201-204. doi: 10.1007/s10517-017-3951-3 PMID: 29181667

29. Полякова Е.А., Дранишников Н.В., Власов Т.Д. Метод моделирования обратимой окклюзии средней мозговой артерии // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2004. – Т. 3. – С. 61-63.

30. Реутов В.П. Биохимическое предопределение NO-синтазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота // Биохимия. - 1999. - Т. 64, № 5. - С. 634–651.

31. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала // Вестник РАМН. - 2000. - № 4. - С. 35–41.

32. Реутов В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих // Успехи биологической химии. - 1995. - Т. 35. - С. 189–228.

33. Реутов В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности // Биохимия. - 2002. - Т. 67. - № 3. - С. 353–376.

34. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия. - 1998. - Т. 63.- № 7. - С.1029–1040.

35. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. Цикл окиси азота – новый метаболический цикл, участвующий в регуляции внутриклеточной сигнализации // Молекулярная биология. - 1998. - Т. 32. - № 2. - С. 377–378.

36. Романова Г. А., Силачев Д. Н., Шакова Ф. М., Квашенникова Ю. Н., Викторов И.В., Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф. Нейропротекторное и антиамнестическое действие Семакса при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2006. - Т. 142, № 12. - С. 618-621. doi: 10.1007/s10517-006-0445-0

37. Романова Г.А. Дизрегуляторные нарушения интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры // Дизрегуляторная патология / Под ред. Г.Н. Крыжановского. - М., 2002. - С. 605-615.

38. Романова Г.А., Барсков И.В., Островская Р.У. и др. Поведенческие и морфологические нарушения, вызванные двусторонним фотоиндуцированным тромбозом мозговых сосудов лобной коры мозга крыс // Патол. физиол. и эксперим. терапия. - 1998.- №2. - С.8-10.

39. Романова Г.А., Шакова Ф.М., Горбатов В.Ю., Квашенникова Ю.Н., Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату на сохранение условного рефлекса пассивного избегания у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга // Бюлл. exper. биол. и мед. - 2010.- V.149.- №3.- С. 261- 264.

40. 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 (4-7) // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2008. - Т. 58. - № 4. С. 458-466.

41. Скворцова В.И., Стаховская Л.В., Айрян Н.Ю. Эпидемиология инсульта в Российской Федерации // Consilium Medicum. - 2005. - №1. - С. 10-12.

42. Стаховская Л. В., Тютюмова Е.А., Федин А. И. Современные подходы к нейропротективной терапии ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2017. - Т.117, №8-2. - С.75-80.

43. Танашян М.М., Домашенко М.А., Максимова М.А. Современная нейропротекция в комплексном лечении пациентов в остром и раннем восстановительном периоде ишемического инсульта // Нервные болезни. – 2017. – Т. 3. – С. 36-40

44. Флеров М.А. Биохимические особенности и взаимодействие нейронов и нейроглии. В кн.: Нейрохимия (Ашмарин И.П., Стукалов П.В. ред.). - М., 1996. – С. 193-200.

45. Хеннерици М. Г., Богуславски Ж., Сакко Р.Л. Инсульт // Клиническое руководство / пер. с англ. под общ. ред. В.И. Скворцовой. - М.: МЕДпресс-информ, 2008. - 224 с.

46. Ходоров Б.И. Механизмы дизрегуляции кальциевого гомеостаза нейронов головного мозга при гиперстимуляции глутаматных рецепторов. // Дизрегуляторная патология / Под. ред. Крыжановского Г.Н. – М.: Медицина, 2002 .
47. Циркин В.И., Трухина С.И. Физиологические основы психической деятельности и поведения человека. М.: Мед. книга, 2001. - 524 с.
48. Цыган Н.В. Повреждение и защита головного мозга при кардиохирургических операциях в условиях искусственного кровообращения (экспериментально-клиническое исследование) // Дис. ... канд. мед. наук. СПб. - 2014.
49. 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.
50. Шамалов Н.А., Стаховская Л.В., Ключихина О.А., Полунина О.С., Полунина Е.А. Анализ динамики основных типов инсульта и патогенетических вариантов ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, №3. - С. 5-10.
51. Шмонин А.А. Перевязка средней мозговой артерии крысы: сравнение модификаций моделей фокальной ишемии мозга у крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – Т. 3. – С. 68-76.
52. Шмонин А.А. Эндогенная нейропротекция при ишемии мозга: эритропоэтин пре- и посткондиционирование. Germany: Издательство «LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co». - 2012
53. Шмонин АА, Мальцева М.Н., Мельникова Е.В., Власов Т.Д. Доклинические исследования лекарственных средств на биологических моделях инсульта // Журнал неврологии и психиатрии. - 2017. – Т. 12, №2. - С. 45-52.
54. Щербак Н.С., Галагудза М.М. Экспериментальные модели ишемического инсульта // Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова. – 2011. –

T.3. – C. 39-47. Mehta M., Riedel W. Dopaminergic enhancement of cognitive function // *Curr. Pharm. Des.* -2006. - V. 12. - P. 2487—2500.

55. Ahmed T.A., Shousha W.G., Abdo S.M., Mohamed I.K., El-Badri N. Human adipose-derived pericytes: biological characterization and reprogramming into induced pluripotent stem cells // *Cell Physiol Biochem.* – 2020. - Vol. 54. - N 2. - P. 271-286.

56. Akbarabadi A., Niknamfar S., Vouseoghi N., Sadat-Shirazi M. S., Toolee H., Zarrindast M. R. Effect of rat parental morphine exposure on passive 174 avoidance memory and morphine conditioned place preference in male offspring // *Physiology & Behavior.* – 2018. – Vol. 184. – P. 143-149. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.11.024

57. Al Mamun A., Chauhan A., Qi S. et al. Microglial IRF5-IRF4 regulatory axis regulates neuroinflammation after cerebral ischemia and impacts stroke outcomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2020. – Vol. 117. – N.3. - P. 1742-1752.

58. Alawieh A., Langley E.F., Tomlinson S. Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice // *Sci Transl Med.* – 2018. – Vol. 10. – P. 441- 469.

59. Albers G.W., Goldstein L.B., Hess D.C. et al. STAIR VII Consortium. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies // *Stroke.* – 2011. – Vol. -42. – N. 9. – P. 2645-2650.

60. Allen C.L., Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke // *International Journal of Stroke.* - 2009. – Vol. 4. – P. 461-70.

61. Amara F., Berbenni M., Fragni M., Leoni G., et al. Neuroprotection by cocktails of dietary antioxidants under conditions of nerve growth factor deprivation // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2015. – P. 1-15. doi.org/10.1155/2015/217258

62. Andrabi S.S., Ali M., Tabassum H., Parveen S., Parvez S. Pramipexole prevents ischemic cell death via mitochondrial pathways in ischemic stroke. *Disease Models & Mechanisms*. - 2019. - Vol. 12. – P. 1-11. doi:10.1242/dmm.033860
63. Anzell A.R., Maizy R., Przyklenk K., Sanderson T.H. Mitochondrial quality control and disease: insights into ischemia-reperfusion injury // *Mol. Neurobiol.* - 2018.- Vol. 55. – P. 2547–2564. DOI 10.1007/s12035-017-0503-9
64. Arany Z., Foo S., Ma Y., Ruas J.L., Bommi-Reddy A., Girnun G. et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α // *Nature*. - 2008. - V. 451. - P. 1008-1013.
65. Arciuch V.G., Elguero M.E., Poderoso J.J., Carreras M.C. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation // *Antioxidants & redox signaling*. - 2012. - V. 16. – N. 10. - P. 1150-1180.
66. Arimura K., Ago T., Kamouchi M., et al. PDGF receptor β signaling in pericytes following ischemic brain injury // *Curr. Neurovasc. Res.* – 2012. – Vol. 9.- N.1. - P. 1-9.
67. Ariza A.C., Deen M.P., Robben J.H. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions // *Front. Endocrinol.* - 2012. - V. 3. – P. 1-8.
68. Armulik A., Genové G., Mäe M., et al. Pericytes regulate the bloodbrain barrier // *Nature*. – 2010. – Vol. 468. – N. 7323. – P. 557-561.
69. Arumugam T.V., Chan S.L., Jo D.G., Yilmaz G., Tang S.C., Cheng A.W. et al. Gamma secretasemediated notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke // *Nature Medicine*. – 2006. - V 12. – P. 621-623.
70. Arumugam T.V., Granger D.N., Mattson M.P. Stroke and T-cells // *Neuromolecular Medicine*. - 2005. – Vol. 7. – P. 229-42.
71. Arumugam T.V., Okun E., Tang S.C., Thundyil J., Taylor S.M., Woodruff T.M. Toll like receptors in ischemia-reperfusion injury // *Shock*. – 2009. – Vol. 32. – P. 4-16.

72. Arundine M., Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury // *Cellular and Molecular Life Sciences*. - 2004. – Vol. 61. – P. 657-668.
73. Austin S., St-Pierre J. PGC1 α and mitochondrial metabolism – emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders // *Journal of Cell Science*. - 2012. – Vol. 125. – P. 4963-4971.
74. Ayer A., Hwang B.Y., Appelboom G., Connolly E.S. Jr. Clinical trials for neuroprotective therapies in intracerebral hemorrhage: a new roadmap from bench to bedside // *Transl. Stroke Res*. – 2012. – Vol. 3. – N. 4. – P. 409-417.
75. Azam S., Jakaria M., Kim I. S., Kim J., Haque M.E., Choi D. K. Regulation of Toll-like receptor (TLR) signaling pathway by polyphenols in the treatment of age-linked neurodegenerative diseases: focus on TLR4 signaling // *Front. Immunol.* - 2019. – Vol. 10. – N. 1000. – P.1-17. doi: 10.3389/fimmu.2019.01000
76. Baghirova S., Hughes B.G., Hendzel M.J., Schulz R. Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells // *MethodsX*. - 2015. Vol. 7. – N. 2. – P. 440–445. doi: 10.1016/j.mex.2015.11.001. eCollection 2015.
77. Barone F.C., Schmidt D.B., Hillegass L.M., Price W.J., White R.F., Feuerstein G.Z. et al. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene-B4 receptor-binding in rat focal ischemia // *Stroke*. – 1992. – Vol. 23. – P. 1337-1347.
78. Barres B. A. New roles for glia // *J. Neurosci.* - 1991. – Vol. 11. – P. 3685–3694.
79. Bell R.D., Winkler E.A., Sagare A.P., et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging // *Neuron*. – 2010. – Vol. 68. – N. 3. – P.409-427.
80. Bhardwaj A., Northington F.J., Ichord R.N., Hanley D.F., Traystman R.J., Koehler R.C. Characterization of ionotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo in rats // *Stroke*. – 1997. – Vol. – 28. – P. 850-856

81. Bouchez C., Devin A. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial reactive oxygen species (ROS): a complex relationship regulated by the cAMP/PKA signaling pathway // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – N. 287. – P. 1-14. doi: 10.3390/cells8040287
82. Bratic A., Larsson N.G. The role of mitochondria in aging // *J Clin. Invest.* - 2013. – Vol. 123. – N. 3. – P. 951–957. doi:10.1172/JCI64125
83. Brierley J. B. Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system // *Greenfield's neuropathology*. – 1984. – P. 125-156.
84. Brouns R., De Deyn P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke // *Clinical Neurology and Neurosurgery*. – 2009. Vol. – 111. – N. 6. – P. 483-495.
85. Brunmair B., Staniek K., Gras F., et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: A common mechanism contributing to their antidiabetic actions? // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53. – P. 1052–1059.
86. Cai W., Liu H., Zhao J. et al. Pericytes in brain injury and repair after ischemic stroke // *Transl. Stroke Res*. – 2017. – Vol. 8. – N. 2. – P. 107-121.
87. Camandola S., Mattson M.P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration // *The EMBO Journal*. – 2017. – Vol. 36. – P. 1474–1492.
88. Canazza A., Minati L., Boffano C., Parati E., Binks S. Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies // *Front Neurol*. – 2014. – Vol. 19. – N. 5. – P. 19. doi.org/10.3389/fneur.2014.00019
89. Canto C., Auwerx J. PGC-1 alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure // *Curr. Opin. Lipidol*. – 2009. – Vol. 20. – P. 98-105.
90. Cartoni R., Leger B., Hock M. B. et al. Mitofusins 1/2 and ERR alpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise // *J. Physiol*. – 2015. – Vol. 567. – P. 349-358.

91. Chang C-Y., Liang M-Z., Chen L. Current progress of mitochondrial transplantation that promotes neuronal regeneration // Translational Neurodegeneration. – 2019. – V. 8. – N. 17. DOI 10.1186/s40035-019-0158-8
92. Charriaut-Marlangue C., Margaill I., Plotkine M., Ben-Ari Y. Early endonuclease activation following reversible focal ischemia // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. - 1995. - Vol. 15. - P. 385-388.
93. Charriaut-Marlangue I., Margaill A., Represa A., Popovici T., Plotkine M. Apoptosis and Necrosis After Reversible Focal Ischemia: An In Situ DNA Fragmentation Analysis // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. - 1996. - Vol. 16. - P. 186-194.
94. Chekman I.S., Belenichev I.F., Yakovleva I.Y., Gorchakova N.A., Buhtiyarova N.V., Morguntsova S.A. et al. Influence of mexidol on early genomic response and morphofunctional parameters of the brain cortex sensorimotor zone neurons after arteria carotis communis occlusion // Oxid Antioxid Med Sci. 2015. – Vol 4. - N. 1. – P. 33-38.
95. Chen H., Hu C. J., He Y. Reduction and restoration of mitochondrial DNA content after focal cerebral ischemia/reperfusion // Stroke. – 2001. – V. 32. – P. 2382-2387.
96. Chen J., Simon R. Ischemic tolerance in the brain // J Neurology. - 1997. – Vol. 48. – N. 2. – P. 306-311.
97. Chen S.T., Hsu C.Y., Hogan E.L., Maricq H., Balentine J.D. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction // Stroke. – 1986. – Vol. 17. – N. 4. – P. 738-743.
98. Cheng A., Wan R., Yang J. L., Kamimura N., Son T.G., Ouyang X. et al. Involvement of PGC-1 α in the Formation and Maintenance of Neuronal Dendritic Spines Nat Commun. - 2012. – Vol 3. – P. 1250-1266. doi:10.1038/ncomms2238.
99. Cheng A.W., Arumugam T.V., Liu D., Khatri R.G., Mustafa K., Kwak S. et al. Pancortin-2 interacts with WAVE1 and Bcl-xL in a mitochondria-associated protein complex that mediates ischemic neuronal death // Journal of Neuroscience. – 2007. – Vol. 27. – P. 1519-28.

100. Choi K., Kim J., Kim G.W., Choi C. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species // *Current Neurovascular Research*. – 2009. - Vol 6. – P. 213-222.
101. Choi Y.H., Gwon A.R., Jeong H.Y., Park J.S., Baik S.H., Arumugam T.V., Jo D.G. Contribution of gamma-secretase to calcium-mediated cell death // *Neuroscience Letters*. – 2010. – Vol. 469. – P. 425-428.
102. Chong Z.Z., Li F.Q., Maiese K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease // *Progress in Neurobiology*. – 2005. – V. 75. – P. 207-46.
103. Chopp M., Li Y. Apoptosis in focal cerebral ischemia // *Acta Neurochir Suppl*. - 1996. - Vol. 66. - P. 21-26.
104. Cimino A., Balduini W., Carloni S., Gelosa P., Guerrini U., Tremoli E., Sironi L. Neuroprotective effect of simvastatin in stroke: A comparison between adult and neonatal rat models of cerebral ischemia // *Neurotoxicology*. – 2005. – V. 26. – P. 929-933.
105. Clark R.K., Lee E.V., Fish C.J. et al. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study // *Brain Res. Bull*. - 1993. - Vol. 31. – N. 5. - P. 565-72.
106. Coculescu B. I., Manole G., Coculescu E.C., Ionescu E., Popoviciu O., Stocheci C.M. Autophagy as a neuronal survival mechanism in ischemic stroke // *Rom J Leg Med*. – 2018. – Vol. 26. P. 333-339. doi: 10.4323/rjlm.2018.333
107. Consoli A., Formoso G. Do thiazolidinediones still have a role in treatment of type 2 diabetes mellitus? // *Diabetes Obes. Metab*. – 2013. – Vol 15. – P. 967-977.
108. Cowell R., Blake K.R., Russel J.W. Localization of the transcriptional coactivator PGC-1alpha to GABAergic neurons during maturation of the rat brain // *J Comp. Neurol*. – 2007. – Vol. 502. – P. 1–18.
109. Dasgupta B., Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 7217–7222.

110. Dawson V.L., Dawson T.M. Nitric oxide in neurodegeneration. Nitric Oxide in Brain Development // Plasticity and Disease. – 1998. – P. 215-229.
111. De la Vega M.C., Burda J., Nemethova M., Quevedo, C., Alcázar, A., Martín, M.E. Possible mechanisms involved in the down-regulation of translation during transient global ischaemia in the rat brain // Biochem. J. – 2001. – V. 357. – P. 819–826.
112. Degenetais E., Thierry A.M., Glowinski J. Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study // Life. Sci. led. - 2003. - Vol. 13. – N. 7. - P.782-792
113. Del Zoppo G.J., Hallenbeck J.M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke // Thrombosis Research. – 2000. – V. 98. – P.73-81
114. Dhar S.S., Wong-Riley M.T. Coupling of energy metabolism and synaptic transmission at the transcriptional level: role of nuclear respiratory factor 1 I regulating both cytochrome c oxidase and NMDA glutamate receptor subunit genes // J Neurosci. – 2009. – Vol. 29. – P. 483–492.
115. Dias D.O., Kim H., Holl D. et al. Reducing pericyte-derived scarring promotes recovery after spinal cord injury // Cell. – 2018. - V. 173. – N. 1. – P. 153-165.e22.
116. Diepen J.A., Robben J.H., Hooiveld G.J., Carmone C., Alsady M., Boutens L. et al. SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes // Diabetologia. – 2017. – Vol. 60. – N. 7. – P. 1304–1313.
117. Dillon L.M., Rebelo A.P., Moraes C.T. The role of PGC-1 coactivators in aging skeletal muscle and heart // IUBMB Life. - 2012. – Vol. 64. – N. 3. – P. 231–241.
118. Dirnagl U. Rodent Models of Stroke // Publisher: Humana Press. - 2010.

119. Dirnagl U. Rodent Models of Stroke. Media // Books Hardcover Book (Book with hard spine and cover) Released, USA. – 2010. - ISBN13, 9781607617495; Publishers, Humana Press Inc.
120. Dirnagl U., Hakim A., Macleod M., Fisher M. et al. A concerted appeal for international cooperation in preclinical stroke research // Stroke. - 2013. – Vol. 44. N. 6. – P.1754-1760. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.0007>
121. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view // Trends Neurosci. – 1999. Vol. 22. – P. 391-397.
122. Du J., Ma M., Zhao Q., Fang L., Chang J., Wang Y., et al. Mitochondrial bioenergetic deficits in the hippocampi of rats with chronic ischemia-induced vascular dementia Neuroscience. 2013; 231: 345-52.
123. Durukan A., Tatlisumak T. Ischemic stroke in mice and rats. Methods Mol Biol. – 2009. – Vol. 573. – P. 95-114
124. Eisele P.S., Salatino S., Sobek J., Hottiger M.O., Handschin C. The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells // The Journal of Biological Chemistry. - 2013. - Vol. 288. – N. 4. - P. 2246–2260. doi: 10.1074/jbc.A112.375253
125. Emberson J., Lees K.R., Lyden P. et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials // Lancet. – 2014. – V. 384. – N. 9958. – P. 1929-1935.
126. Farshbaf J.M., Kiani-Esfahani A. Succinate dehydrogenase: prospect for neurodegenerative diseases // Mitochondrion. - 2018. – V. 42. P. 77-83. doi: org/10.1016/j.mito.2017.12.002
127. Faulkner J.R., Herrmann J.E., Woo M.J, Tansey K.E., Doan N.B., Sofroniew M.V. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury // J Neurosci. – 2004. – V. 24. – N.9. – P. 2143-2155.

128. Feigin V., Brainin M., Norrving B. et al. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet // International Journal of Stroke. – 2022. – Vol. 17. – N. 1. - P. 18-29
129. Feigin Valery L. et al. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // The Lancet. Neurology. – 2021. – Vol. 20. – P. 795 - 820.
130. Fernandez-Marcos P.J., Auwerx J. Regulation of PGC-1 alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis // Am. J Clin. Nutr. – 2011. – Vol. 93. – P. 884-890.
131. Fisher M., Feuerstein G., Howells D.W., Hurn P.D., Kent T.A., Savitz S.I., Lo E.H. STAIR Group. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations // Stroke. – 2009. – Vol. 40. – N. 6. P. 2244-2250. doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.541128
132. Flippo K.H., Strack S. Mitochondrial dynamics in neuronal injury, development and plasticity // Journal of Cell Science. – 2017. – Vol. 130. - P. 671-681. doi:10.1242/jcs.171017
133. Gallo-Payet N. Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH // Journal of Molecular Endocrinology. – 2016. – V. 56. – P. 135–156. doi: 10.1530/JME-15-0257
134. Gao W., Xiong Y., Li Q., Yang H. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: a journey from molecular to nano therapeutics. Front. Physiol. – 2017. – Vol. 8. – N. 508. - P. 1-20. doi:10.3389/fphys.2017.00508
135. Garcia J.H., Liu K.F., Fisher M., Tatlisumak T. Non-neuronal cells, their responses to focal brain ischemia 1996; 6: 180.
136. Garcia, J.H. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex / J.H. Garcia, K.F. Liu, K.L. Ho // Stroke. - 1995. - Vol. 26. - № 4. - P. 636-642.

137. Garcia, J.H. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat / J. Garcia, Y. Yoshida, H. Chen, Y Li, Z. Zhang, J. Lian, Chen S., M. Chopp // *Am. J. Pathol.* - 1993. - Vol. 142. - № 2. - P. 623-635.
138. Gelderblom M., Leypoldt F., Steinbach K., Behrens D., Choe C.U., Siler D.A. et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke // *Stroke*. – 2009. – Vol. 40. – P. 1849-1857.
139. Genova M.L., Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. - Vol. 1837. - P. 427–443.
140. Ghorl A., Freimann F.B., Nieminen-Kelhä M. et al. EphrinB2 activation enhances vascular repair mechanisms and reduces brain swelling after mild cerebral ischemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2017. - 375):867-878.
141. Gibbs W.S., Weber R.A., Schnellmann R.G., Adkins D.A.L. Disrupted mitochondrial genes and inflammation following stroke // *Life Sci.* – 2016. – Vol. 1. – N. 166.- P. 139-148. doi: 10.1016/j.lfs.2016.09.021
142. Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future // *Neuropharmacology*. – 2008. – V. 55. – N. 3. – P. 363-389.
143. Goldman-Rakic P.S., Selemon L.D., Schwartz M.L. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey // *Neurosci.* - 1984. - Vol. 12. - P. 719-743.
144. Graham S.M., McCullough L.D., Murphy S.J. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care // *Comp Med*. – 2004. – Vol. 54. – N. 5. – P. 486-496.
145. Guan R., Zou W., Dai X., Yu X., Liu H., Chen Q., Teng W. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke // *Journal of Biomedical Science*. – 2018. – Vol. 25. – N. 1. – P. 87. [doi:10.1186/s12929-018-0487-4](https://doi.org/10.1186/s12929-018-0487-4)
146. Guo X., Dason E.S., Zanon-Moreno V., Jiang Q., Nahirnyj A., Chan D., et al. PGC-1 α signaling coordinates susceptibility to metabolic and oxidative

injury in the inner retina // *Am. J Pathol.* – 2014. – Vol. 184. P. 1017–1029. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.12.012.

147. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Popov V.N. Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways // *Frontiers in Genetics.* – 2019. – Vol. 10. - P. 1-12.

148. Gürer G., Gursoy-Ozdemir Y., Erdemli E., Can A., Dalkara T. Astrocytes are more resistant to focal cerebral ischemia than neurons and die by a delayed necrosis // *Brain Pathol.* – 2009. – Vol. 19. – N. 4. – P. 630-641.

149. Hall E.D. Inhibition of lipid peroxidation in central nervous system trauma and ischemia. *Journal of the Neurological Sciences* 1995, 134:79-83;

150. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honore J.-C., Noueihed B., Zhou T., Nadeau-Vallee M., Hou X., Lavoie J.-C., Mitchell G., Mamer O.A., Chemtob S. G-Protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2014. – Vol. 34. – P. 285-293.

151. Han B., Jiang W., Liu H., Wang J., Zheng K., Cui P., Feng Y., Dang C., Bu Y., Wang Q.M., Ju Z., Hao J. Upregulation of neuronal PGC-1 α ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion // *Theranostics.* – 2020. - Vol. 10 (6). – P. 2832-2848. doi: 10.7150/thno.37119

152. Harrington E.P., Bergles D.E., Calabresi P.A. Immune cell modulation of oligodendrocyte lineage cells // *Neurosci Lett.* – 2020. – V. 715. P. 134601. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134601

153. He W., Miao F.J., Lin D.C., Schwandner R.T., Wang Z., Gao J. et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors // *Nature.* - 2004. - V. 429. - N 6988. - P. 188-193.

154. Heal D., Cheetham S., Smith S. The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. // *Neuropharmacology.* - 2009. - V. 57. – N.7-8. - P.608-618

155. Hong F., Pan S., Guo Y., Xu P., Zhai Y. PPARs as nuclear receptors for nutrient and energy metabolism molecules // *Molecules*. - 2019. – Vol. 24. – P. 2414-2545. doi:10.3390/molecules24142545
156. Hudome S., Palmer C., Roberts R.L., Mauger D., Housman C., Towfighi J. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat // *Pediatric Research*. – 1997. – Vol. 41. – P. 607-16.
157. Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease // *Neuron*. – 2017. – Vol. 96. – N. 1. – P. 17-42
158. Im J.Y., Kim D., Paik S.G., Han P.L. Cyclooxygenase-2-dependent neuronal death proceeds via superoxide anion generation // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 41. – P. 960-972.
159. Ishikawa M., Zhang J.H., Nanda A., Granger D.N. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation // *Frontiers in Bioscience*. - 2004. – V. 9. – P. 1339-47
160. Ito M., Komai K., Mise-Omata S. et al. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery // *Nature*. – 2019. – Vol. 565. – N. 7738. – P.246-250.
161. Janzer R.C., Raff M.C. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells // *Nature*. – 1987. – Vol. 325. – N. 6101. – P. 253-257.
162. Jauch E.C., Saver J.L., Adams Jr., H.P. et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association // *Stroke*. – 2013. – Vol. 44. – V. 870-947.
163. Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R., Jalal F.Y., Rosenberg G.A. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke // *Journal of Neuroinflammation*. – 2019. - 16(142):1-24. doi.org/10.1186/s12974-019-1516-2
164. Jean LeBlanc N., Guruswamy R., ElAli A. Vascular endothelial growth factor isoform-B stimulates neurovascular repair after ischemic stroke by

promoting the function of pericytes via vascular endothelial growth factor receptor-1 // *Mol. Neurobiol.* – 2018. – Vol. 55. – N. 5.- P. 3611-3626.

165. Jiang S., Li T., Ji T., Yi W., Yang Z., Wang S., Yang Y., Gu C. AMPK: Potential Therapeutic Target for Ischemic Stroke // *Theranostics.* - 2018. – Vol. 8. – N.16. – P. 4535-4551. doi: 10.7150/thno.25674

166. Jin R., Yang GJ, Li GH: Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells // *Journal of Leukocyte Biology.* - 2010. – Vol. 87. - P. 779-89.

167. Joshi A.U., Minhas P.S., Liddelw S.A. et al. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration // *Nat Neurosci.* – 2019. – Vol. 22. - N. 10. – P. 1635-1648.

168. Kaneko N., Herranz-Pérez V., Otsuka T., et al. New neurons use SlitRobo signaling to migrate through the glial meshwork and approach a lesion for functional regeneration // *Sci. Adv.* – 2018. – Vol. 4. – N.12. – P:eaav0618. doi: 10.1126/sciadv.aav0618

169. Karch J., Bround M.J., Khalil H., Sargent M.A., Latchman N., Terada N. et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and // *CypD. Sci. Adv.* – 2019. – Vol. 5. – N. 8. – P. 4597-4604.

170. Karow M., Sánchez R., Schichor C. et al. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells // *Cell Stem Cell.* – 2012. – Vol. 11. – N. 4. – P. 471-476.

171. Kernan W.N., Ovbiagele B., Black H.R. et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association // *Stroke.* – 2014. – Vol. 45. – P. 2160-2236

172. Kettenmann H., Ransom B.R. The Concept of Neuroglia: A Historical Perspective // *Neuroglia*, 2nd edn (New York, 2004; online edn, Oxford Academic). – 2009. – P. 1-16 <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195152227.003.0001>

173. Khodorov B., Pinelis V., Storozhevikh T., Vergun O., Vinskaya N. Dominant role of mitochondria in protection against a delayed neuronal Ca^{2+} overload induced by endogenous excitatory amino acids following a glutamate pulse // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 393. – P. 135–138.
174. Kiewert C., Mdzinarishvili A., Hartmann J., Bickel U., Klein J. Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice // *Brain Res.* – 2010. – Vol. 1312. – P. 101-107.
175. Kim Y, Lee S, Zhang H, et al. CLEC14A deficiency exacerbates neuronal loss by increasing blood-brain barrier permeability and inflammation. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):48.
176. Kirkley K.S., Popichak K.A., Afzali M.F., Legare M.E., Tjalkens R.B. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity // *J Neuroinflammation*. – 2017. – Vol. 14. – N. 1. – P. 1499.
177. Kitagawa K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain // *FEBS Journal*. – 2007. – Vol. 274. – P. 3210–3217.
178. Kogure, K., Yamasaki, Y., Malsuo, Y. et al. Inflammation of the brain after ischemia // *Acta neurochirurgica. Supplement.* – 1996. - Vol. 66. - P. 40-43.
179. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area // *Jpn J Stroke.* – 1986. – Vol. 8. – P. 1-8.
180. Kolb B. Function of the cortex of the rat: a comparative review // *Brain Res. Rev.* 1984. - Vol. 8. - P. 65-98.
181. Kuhn S., Gritti L., Crooks D., Dombrowski Y. Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond // *Cells.* – 2019. – Vol. 8. – N. 11. - P. 1424. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>
182. Kukreja R.C., Xi L. eNOS phosphorylation: A pivotal molecular switch in vasodilation and cardioprotection? // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* - 2007. – Vol. 42. – P. 280-282.

183. Lalancette-Hébert M., Gowing G., Simard A., Weng Y.C., Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain // *J Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – N. 10. – P. 2596-2605.
184. Lambertsen K.L., Finsen B., Clausen B.H. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? // *Acta Neuropathol.* 2019. – Vol. 137. – N. 5. – P. 693-714.
185. Lee G.A., Lin T., Chen C. et al. Interleukin 15 blockade protects the brain from cerebral ischemia-reperfusion injury // *Brain Behav. Immun.* – 2018. – V. 73. – P.562-570.
186. Lee I., Kesner R.P. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory // *J. Neurosci.* - 2003. - Vol. 23. - P. 1517-1523.
187. Li Y., Chopp M., Jiang N. et al. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* -1995. - Vol. 15. - N 3. - P. 389-397.
188. Li Y., Zhu Z., Lu B. et al. Rosiglitazone ameliorates tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage after stroke // *CNS Neurosci Ther.* -2019. – Vol. 25. – N. 12. – P.1343-1352.
189. Li Z., Cogswell M., Hixson K., Brooks-Kayal A.R., Russek S.J. Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF-1) Controls the activity dependent transcription of the GABA-A receptor beta 1 subunit gene in neurons // *Front. Mol. Neurosci.* – 2018. – Vol. 11. – N. 285. doi: 10.3389/fnmol.2018.00285
190. Liddelow S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia // *Nature.* – 2017. – Vol. 541. – N. 7638. – P. 481-487
191. Lin J., Wu P.H., Tarr P.T. et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice // *Cell.* – 2004. – Vol. 119. – P. 121–35.

192. Linnik M.D., Zobrist R.H., Hatfield M.D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats // J. Stroke. - 1993. - Vol. 24. – N. 12. - P. 2002-2008.
193. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiological Reviews. – 1999. Vol. 79. – P. 1431-568.
194. Lisak R.P., Benjamins J. Melanocortins, melanocortin receptors and multiple sclerosis // Brain Sci. – 2017. – Vol. 7. – N. 8. – P. 104. doi:10.3390/brainsci7080104
195. Liu F., Lu J., Manaenko A., Tang J., Hu Q. Mitochondria in ischemic stroke: new insight and implications // Aging and Disease. – 2018. - Vol. 9. – N. 5. P. 924-937. doi.org/10.14336/AD.2017.1126
196. Liu L.R., Liu J.C., Bao J.S., Bai Q.Q., Wang GQ. Interaction of microglia and astrocytes in the neurovascular Unit // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 1024.
197. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S. C. NF- κ B signaling in inflammation // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2017. – Vol 2. – P. e17023. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
198. Liu X., Quan N. Microglia and CNS interleukin-1: beyond immunological concepts // Front. Neurol. - 2018. – Vol. 9. – N.8. – P. 1-11. doi: 10.3389/fneur.2018.00008
199. Lo E.H., Broderick J.P., Moskowitz M.A. tPA and proteolysis in the neurovascular unit // Stroke. – 2004. – Vol. 35. – N. 2. - P. 354-356.
200. Lo E.H., Rosenberg G.A. The neurovascular unit in health and disease: introduction // Stroke. – 2009. – Vol. 40. (3) - S2-3.
201. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats // Stroke. – 1989. – Vol. 20. – P. 84-91.
202. Love S. Oxidative stress in brain ischemia // Brain Pathology. – 1999. – Vol. 9. – P. 119-131.

203. Lu Z., Xu X., Hu X., Fassett J., Zhu G., Tao Y. et al. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – Vol. 13. – P. 1011-1022
204. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia // *Frontiers in Neuroscience.* – 2015. – Vol. 9. – A. 320. - P. 66-76.
205. Luo J., Sun D. Physiology and pathophysiology of Na⁺/H⁺ exchange isoform 1 in the central nervous system // *Current Neurovascular Research.* – Vol. 2007. – Vol. 4. P. 205-215.
206. Magistretti P.J. Coupling of Cerebral Blood Flow and Metabolism // *Primer on Cerebrovascular Diseases.* – 1997. – P. 70-75.
207. Magistretti P.J., Pellerin L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism: relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1996. – Vol. 777. - P. 380–387.
208. Magistretti P.J., Pellerin L. The cellular bases of functional brain imaging: Evidence for astrocyte-neuron metabolic coupling *Neuroscientist.* - 1997. – Vol. 3. – P. 361-365. doi: 10.1177/107385849700300608
209. Martin H.G., Wang Y.T. Blocking the deadly effects of the NMDA receptor in Stroke // *Cell.* – 2010. – Vol. 140. – P. 174-176.
210. Mattson M.P. Neuroprotective signal transduction: Relevance to stroke // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* – 1997. – Vol. 21. – P. 193-206.
211. Mattson M.P. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders // *Experimental Gerontology.* – 2009. – Vol. 44. - P. 625-33
212. Mattson M.P., Culmsee C., Yu Z.F. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke // *Cell Tiss. Res.* - 2000. - Vol. 301.- P. 173-187.
213. McConnell V.C. Calculations for the Veterinary Professional // Publisher: Ames. IA: Iowa State University Press. – 2000.

214. McGeer P.L., Kawamala T., Walker D.G. et al. Microglia in degenerative neurological disease // *J. Glia*. - 1993. - Vol. 7. – N. 1. - P. 84-92.
215. Medvedeva E.V., Dmitrieva V.G., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. Semax, an analog of ACTH (4-7), regulates expression of immune response genes during ischemic brain injury in rats // *Mol. Genet. Genomics*. – 2017. – Vol. 292. – N. 3. – P. 635-653. doi: 10.1007/s00438-017-1297-1.
216. Medvedeva E.V., Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Limborska S.A., Skvortsova V.I., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. The peptide Semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: Genome wide transcriptional analysis // *BMC Genomics*. – 2014. – Vol. 15. – P. 228–240.
217. Mehta S.L., Manhas N., Rahubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics // *Brain Research Reviews*. - 2007. – Vol. 54. P. 34-66
218. Mergenthaler P., Dirnagl U., Meisel A. Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models // *Metabolic Brain Disease*. – 2004. – Vol. 19. – P. 151-67.
219. Mergenthaler P., Meisel A. Do stroke models model stroke? // *Dis Model Mech*. – 2012. – Vol. 5. – N. 6. – P. 718-725
220. Merrill G.F., Kurth E.J., Hardie D.G., Winder W.W. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle // *Am J Physiol*. – 1997. – V. 273. – P. 1107–1112.
221. Morgan J.A., Brewer R.J., Nemeh H.W., Gerlach B., Lanfear D.E., Williams C.T., Paone G. Stroke while on long-term left ventricular assist device support: incidence, outcome, and predictors // *ASAIO J*. – 2014. – Vol. 60. – N. 3. – P. 284-289. doi: 10.1097/MAT.0000000000000074
222. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat // *Journal of Neurosci Methods*. – 1984. – Vol. 11. – P. 47–60.

223. Morrish F., Hockenbery D. MYC and mitochondrial biogenesis // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2014. – Vol. 4. – P. a014225. doi: 10.1101/cshperspect.a014225
224. Mun-Bryce S., Rosenberg G.A. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease // J Cereb Blood Flow Metab. – 1998.- Vol. 18. – N. 11. – P. 1163-1172.
225. Nagel S., Papadakis M., Hoyte L., Buchan AM. Therapeutic hypothermia in experimental models of focal and global cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage // Expert Rev. Neurother. – 2008. – Vol. 8. – P. 1255-1268.
226. Nakagomi T., Kubo S., Nakano-Doi A. et al. Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells // Stem Cells. – 2015. – Vol. 33. – N. 6. – P. 1962-1974
227. Nakagomi T., Molnár Z., Nakano-Doi A. et al. Ischemia-induced neural stem/progenitor cells in the pia mater following cortical infarction // Stem Cells Dev. – 2011. – Vol. 20. – N. 12. – P. 2037-2051.
228. Nakamura K., Ikeuchi T., Nara K. et al. Perlecan regulates pericyte dynamics in the maintenance and repair of the blood-brain barrier // J Cell Biol. – 2019. – Vol. 218. – N. 10. – P. 3506-3525.
229. Naoi M., Wu Y., Shamoto-Nagai M., Maruyama W. Mitochondria in neuroprotection by phytochemicals: bioactive polyphenols modulate mitochondrial apoptosis system, function and structure // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20. – P. 2451. doi:10.3390/ijms20102451
230. Naryzhnaya N.V., Maslov L.N., Oeltgen P.R. Pharmacology of mitochondrial permeability transition pore inhibitors // Drug Dev Res. – 2019. – P. 1–18. doi: 10.1002/ddr.21593
231. Neumar R.W. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury // Annals of Emergency Medicine. – 2000. – V. 36. – P. 483-506.
232. Nijland P.G., Witte M.E., van het Hof B., van der Pol S., Bauer J., Lassmann H. et al. Astroglial PGC-1alpha increases mitochondrial antioxidant

capacity and suppresses inflammation: implications for multiple sclerosis // *Acta Neuropathol. Commun.* – 2014. V. – 2. - P. 170- 172.

233. Nikolakopoulou A.M., Montagne A., Kisler K. et al. Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. *Nat. Neurosci.* 2019. – Vol. 22. – N. 7. – P. 1089-1098.

234. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy // *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research.* – 2013. – Vol. 1833.- P. 3448-3459.

235. Ohira M., Endo K., Saiki A., Miyashita Y., Terai K., Murano T. et al. Atorvastatin and pitavastatin enhance lipoprotein lipase production in L6 skeletal muscle cells through activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase // *Metabolism.* – 2012. – V. 61. - P. 1452-60.

236. Okun E., Griffioen K.J., Lathia J.D., Tang S.C., Mattson MP., Arumugam T.V. Toll-like receptors in neurodegeneration // *Brain Research Reviews.* – 2009. – V. 59. P. 278-292.

237. Otxoa-de-Amezaga A., Miró-Mur F., Pedragosa J. et al. Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation // *Acta Neuropathol.* -2019. – V. 137. – N. 2. – P. 321-341.

238. Paxinos G, Watson S. Atlas of Anatomy of Rat Brain. The Rat brain in stereotaxic coordinates // San Diego: Academic Press. - 1986.

239. Paxinos G., Watson C. Atlas of anatomy of rat brain. In: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates // 3rd San Diego, Calif. Academic Press Inc. - 1997.

240. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates // San Diego: Academic Press. – 1998. - P. 474.

241. Pearson S.J., Crudek C., Mercer K. et al. Electrochemical detection of human brain transmitter amino acids by high-performance liquid chromatography of stable o-phthalaldehyde-sulphite derivatives // *J. Neural Transm.* -1991. Vol. 86.- P. 151-157.

242. Pelvig D.P., Pakkenberg H., Stark A.K., Pakkenberg B. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging*. – 2008. – Vol. 29.- N. 11. – P. 1754-1762.
243. Petegnief V., Fontnieves M., Martín M.E., Salinas M., Planas A.M. Nitric oxide mediates NMDA-induced persistent inhibition of protein synthesis through dephosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and eukaryotic initiation factor 4G proteolysis // *Biochem J*. – 2008. Vol. 411. – N. 3. – P. 667-677.
244. Petegnief V., Planas A.M. SIRT1 regulation modulates stroke outcome. *Translational Stroke Research*. – 2013. – Vol. 4. – N. 6. – P. 663-671. doi: 10.1007/s12975-013-0277-y
245. Price C.J., Menon D.K., Peters A.M. et al. Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke – An imaging-based study // *Stroke*. – 2004. – Vol. 35.- P.1659-64.
246. Puigserver P., Spiegelman B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator // *Endocr Rev*. – 2003. – Vol. 24. – P. 78–90.
247. Puigserver P., Wu Z., Park C. W., Graves R., Wright M., Spiegelman B.M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis // *Cell*. -1998. – Vol. 92. – N. 6. – P. 829–839.
248. Pulsinelli W.A. The ischemic penumbra in stroke // *Sci. Amer. Sci. Med*. - 1995. -Vol. 2. - P.16-25.
249. Ramos S.E, Motori E., Bruser C., Kuhl I., Yeroslaviz A., Ruzzenente B. et al. Mitochondrial fusion is required for regulation of mitochondrial DNA replication // *PLoS Genet*. – 2019. – Vol. 15. – N. 6. - P. e10080-85. doi: 10.1371/journal.pgen.1008085
250. Rangwala S.M. et al. Estrogen-related receptor alpha is essential for the expression of antioxidant protection genes and mitochondrial function // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2007. – Vol. 357. – P. 231–236.

251. Rasbach K.A., Schnellmann R.G. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis // *J Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – V. 325. – P. 536–43.
252. Ridder D.A., Schwaninger M. NF-kappa B signaling in cerebral ischemia // *Neuroscience.* – 2009. – Vol. 158. – P. 995-1006.
253. Rinner W.A., Bauer J., Schmidts M. et al. Resident microglia and hematogenous macrophages as phagocytes in adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis: an investigation using rat radiation bone marrow chimeras // *Glia.* - 1995. - Vol. 14. – N. 4. - P. 257-266.
254. Romanova G.A., Gorbatov V.Y., Shakova F.M. Effect of antibodies to glutamate on retention of conditioned passive avoidance response in rats with ischemic injury of the prefrontal cortex // *Bull. Exp. Biol. Med.* - 2012. - Vol.153. N. 1. - P. 12-15.
255. Romanova G.A., Silachev D.N., Shakova F.M. Neuroprotective and anti-amnesic actions of Semax in experimental ischemic cerebral cortical infarct // *Bull. Exp. Biol. Med.* - 2006. - Vol. 2 - P. 612-628.
256. Rosenberg P.A., Aizenman E. Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex // *Neurosci Lett.* -1989. – Vol. 103. – N. 2. – P. 162-168.
257. Rother J. Neuriprotection does not work // *Stroke.* - 2008. - Vol. 39. - P. 523-524.
258. Russo E., Nguyen H., Lippert T., Tuazon J., Borlongan C.V., Napoli E. Mitochondrial targeting as a novel therapy for stroke // *Brain Circ.* – 2018. – Vol. 4. – P. 84-94. doi:10.4103/bc.bc_14_18
259. Russo M.A., Tomino C., Vernucci E., Limana F., Sansone L., Frustaci A. Hypoxia and inflammation as a consequence of β -fibril accumulation: a perspective view for new potential therapeutic targets // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* -2019. – P. 1-10. Article ID 7935310. doi.org/10.1155/2019/7935310
260. Sadoul R. Dubois-Dauphin M., Fernandez P.A. et al. Mechanisms of neuronal cell death // *J. Adv. Neurol.* - 1996. - Vol. 71. - P. 419-424.

261. Sano M., Tokudome S., Shimizu N., Yoshikawa N., Ogawa C., Shirakawa K. et al. Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor α coactivator 1a // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. - P. 25970–25980.
262. Santos T.W., Pereira Q.C., Teixeira L., Gambero A., Villena J.A., Ribeiro M.L. Effects of polyphenols on thermogenesis and mitochondrial biogenesis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19. – 2757.- N.9. - P.1-14. doi:10.3390/ijms19092757
263. Scarpulla R.C., Vega, R.B., Kelly D.P. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol. 23. – P. 459–466. doi: 10.1016/j.tem.2012.06.006
264. Schlachetzki F., Zhu C., Pardridge W.M. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood±brain barrier // *Journal of Neurochemistry.* – 2002. – Vol. 81. – P. 203-206.
265. Schönenberger M.J., Kovacs W.J. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2015. – Vol. 3. – N. 42. doi: 10.3389/fcell.2015.00042
266. Seguela P., Geffard M., Buijs R., Le Moal M. Antibodies against gamma-aminobutyric acid: specificity studies and immunocytochemical results // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1984. - Vol. 81. – N. 12. - P. 3888-3892.
267. Selvin E., Bolen S., Yeh H.C., Wiley C., Wilson L.M., Marinopoulos S.S. et al. Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review // *Arch Intern Med.* – 2008. – Vol. 168. P. 2070-2080.
268. Semple R., Chatterjee V., O’Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease // *J Clin. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – V. 16. – P. 581–589.
269. Seo A.Y., Joseph A.-M., Dutta D., Hwang J.C.Y., Aris J.P., Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more // *Journal of Cell Science.* - 2010. – V. 123.- P. 2533-2542.

270. Seo J.H., Miyamoto N., Hayakawa K. et al. Oligodendrocyte precursors induce early blood-brain barrier opening after white matter injury // *J Clin Invest.* -2013. – Vol. 123. - N. 2. – P. 782-786.
271. Shen J., Xu G., Zhu R. et al. PDGFR- β restores blood-brain barrier functions in a mouse model of focal cerebral ischemia // *J Cereb. Blood Flow Metab.* – 2019. – Vol. 39. - N. 8. – P. 1501-1515.
272. Shi H. Hypoxia inducible factor 1 as a therapeutic target in ischemic stroke // *Curr Med Chem.* – 2009. – Vol. 16. - N34. – P. 4593-4600.
273. Shi Z.S, Duckwiler G.R., Jahan R. et al. Early blood-brain barrier disruption after mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke // *J Neuroimaging.* -2018. – Vol. 28. – N. 3. – P. 283-288.
274. Shimizu F., Sano Y., Saito K. et al. Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier // *Neurochem. Res.* – 2012. – V. 37. – N. 2. - P. 401-409.
275. Shmonin A.A., Baisa A.E., Melnikova E.V., Vavilov V.N., Vlasov T.D. Protective Effects of early ischemic preconditioning in focal cerebral ischemia in rats: the role of collateral blood circulation // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* -2012. – Vol. 42. – N. 6. – P. 643-650.
276. Shulga A., Blaesse A., Kysenius K., Huttunen H.J., Tanhuanpää K., Saarma M. et al. Thyroxin regulates BDNF expression to promote survival of injured neurons // *Mol. Cell Neurosci.* – 2009. Vol. 42. – P. 408–418. doi: 10.1016/j.mcn.2009.09.002
277. Silachev D.N., Shram S.I., Shakova F.M., Romanova G.A. Formation of spatial memory in rats with ischemic lesions to the prefrontal cortex; effects of a synthetic analog of ACTH (4-7) // *Neuros Beh. Phys.* - 2009. - Vol. 8. - P. 749-757.
278. Šileikytė J., Hindawi M.F. The mitochondrial permeability transition in mitochondrial disorders // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* - 2019. ID 3403075. doi.org/10.1155/2019/3403075

279. Sladojevic N., Stamatovic S.M., Johnson A.M. et al. Claudin-1-dependent destabilization of the blood-brain barrier in chronic stroke // *J Neurosci.* 2019. – Vol. 39. – N. 4. – P. 743-757.
280. Stamatovic S.M., Phillips C.M., Martinez-Revollar G., Keep R.F., Andjelkovic A.V. Involvement of epigenetic mechanisms and non-coding RNAs in blood-brain barrier and neurovascular unit injury and recovery after stroke // *Front Neurosci.* – 2019. Vol. 13. – P. 864.
281. Stefanic P., Dolenc M.S. Aspartate and glutamate mimetic structures in biologically active compounds // *Curr Med Chem.* – 2004. - Vol. 11. – N.8. – P. 945-968.
282. Stoll G., Jander S., Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions // *Progress in Neurobiology.* – 1998. – Vol. 56. – P. 149-71
283. Stowe A.M., Adair-Kirk T.L., Gonzales E.R., Perez R.S., Shah A.R., Park T.S., Gidday J.M. Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion // *Neurobiology of Disease.* – 2009. – Vol. 35. – P. 82-90.
284. St-Pierre J., Drori S., Uldry M., Silvaggi J.M., Rhee J., Jager S. et. al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators // *Cell.* – 2006. – Vol. 127. - P. 397-408.
285. Suh S.W., Shin B.S., Ma H.L., Van Hoecke M., Brennan A.M., Yenari M.A., Swanson R.A. Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke // *Annals of Neurology.* – 2008. – Vol. 64. – P. 654-63
286. Sumbria RK, Klein J, Bickel U: Acute Depression of Energy Metabolism after Microdialysis Probe Implantation is Distinct from Ischemia-Induced Changes in Mouse Brain. *Neurochem Res* 2011, 36:109-16
287. Sun Y., Zhu Y., Zhong X., Chen X., Wang J., Ying G. Crosstalk between autophagy and cerebral ischemia // *Front. Neurosci.* – 2019. – Vol. 12. P. 1022. doi: 10.3389/fnins.2018.01022

288. Tachibana M., Yamazaki Y., Liu C.C., Bu G., Kanekiyo T. Pericyte implantation in the brain enhances cerebral blood flow and reduces amyloid- β pathology in amyloid model mice // *Exp Neurol.* – 2018. – Vol. 300. - P.13-21.
289. Tagaya M., Liu K.F., Copeland B. et al. DNA Scission After Focal Brain Ischemia // *Stroke.* – 1997. – Vol. 28. - P. 1245-1254.
290. Tam S.-Y., Roth R. Mesoprefrontal dopaminergic neurons: Can tyrosine availability influence their functions? // *Biochem. Pharmacol.* - 1997. - V. 53. - N 4. - P. 441-453.
291. Tang S.C., Arumugam T.V., Xu X.R., Cheng A.W., Mughal M.R., Jo D.G. et al. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2007. – Vol. 104. – P. 13798-13803.
292. Tenenbaum A., Motro M., Fisman E.Z. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons // *Cardiovasc Diabetol.* – 2005. – Vol. 4. – P. 14.
293. Thundyil J., Tang S.C., Okun E., Shah K., Karamyan V.T., Li Y.I: Evidence that adiponectin receptor 1 activation exacerbates ischemic neuronal death // *Exp. Transl. Stroke Med.* – 2010. – Vol. 2. – P. 15
294. Titova E., Ostrowski R.P., Zhang J.H., Tang J.P. Experimental models of subarachnoid hemorrhage for studies of cerebral vasospasm // *Neurological Research* 2009. – Vol. 31. - P. 568-81.
295. Traystman R.J. Animal models of focal and global cerebral ischemia // *ILAR J.*- 2003. – Vol. 44. – N. 2. - P. 85-95
296. Tretter L., Patocs A., Chinopoulos C. Succinate an intermediate in metabolism signal transduction, ROS, hypoxia and tumorigenesis // *Biochimica et Biophysica Act.* – 2016. – Vol. 1857. – P. 1086–1101.
297. Tritos N.A., Mastaitis J.W., Kokkotou E.G., Puigserver P., Spiegelman B.M., Maratos-Flier E. Characterization of the peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 alpha (PGC 1alpha) expression in the murine brain // *Brain Res.* – 2003. – Vol. 961. – P. 255-260.

298. Tsunemi T., La Spada A.R. PGC-1 α at the intersection of bioenergetics regulation and neuronal function: From Huntington's disease to Parkinson's disease and beyond // *Prog Neurobiol.* – 2012. – Vol. 97. – P. 142–151.
299. Tuttolomondo A., Di Raimondo D., di Sciacca R., Pinto A., Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke // *Current Pharmaceutical Design.* – 2008. – Vol. 14. – P. 3574-3589.
300. Uchiyama Y., Koike M., Shibata M. Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia // *Autophagy.* – 2008. – Vol. 4. – P. 404-408
301. Uittenbogaard M., Chiaramello A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases // *Curr. Pharm. Des.* 2014.- Vol. 20. – N. 35. - P. 5574-5593
doi.org/10.2174/1381612820666140305224906
302. Uittenbogaard M., Chiaramello A., Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des.* 2014. 20(35): 5574–5593
303. Valle I., Alvarez-Barrientos A., Arza E., Lamas S., Monsalve M. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – Vol. 66. – P. 562-573.
304. Vats D., Mukundan L., Odegaard J.I., Zhang L., Smith K.L., Morel C.R. et al. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation // *Cell metabolism.* – 2006. – Vol. 4. – P. 13-24.
305. Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Research.* – 2008. – Vol. 79. – P. 208–217. doi:10.1093/cvr/cvn098
306. Vergun O., Keelan J., Khodorov B., Duchen M. Glutamate-induced mitochondrial depolarisation and perturbation of calcium homeostasis in cultured rat hippocampal neurones // *Journal of Physiology.* – 1999. – Vol. 519. – N. 2. - P.451—466
307. Villena J.A., Kralli A. ERR α : a metabolic function for the oldest orphan *Trends Endocrinol Metab.* – 2008. – Vol. 19. – N. 8. -. P. 269–276.

308. Von Bartheld C.S., Bahney J., Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting // *J Comp Neurol.* – 2016. - Vol. 524. - N. 18. – P. 3865-3895.
309. Wang L., Xiong X., Zhang L., Shen J. Neurovascular Unit: A critical role in ischemic stroke // *CNS Neurosci Ther.* – 2021. - Vol. 27. - P. 7–16. <https://doi.org/10.1111/cns.1356>
310. Wang Q., Ding H., Chen S. et al. Hypertonic saline mediates the NLRP3/IL-1 β signaling axis in microglia to alleviate ischemic blood-brain barrier permeability by downregulating astrocyte-derived VEGF in rats // *CNS Neurosci. Ther.* – 2020. – V. 26. – N. 10. – P. 1045-1057
311. Wang Q., Tang X.N., Yenari M.A. The inflammatory response in stroke // *Journal of Neuroimmunology.* – 2007. – Vol. 184. – P. 53-68.
312. Wang W., Li M., Chen Q., Wang J. Hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke: mechanisms, models, and biomarkers // *Mol Neurobiol.* – 2015. - V. 52. – N. 3. – P. 1572-1579.
313. Wang Y.L., Hui Y.N., Guo B., Ma J.X. Strengthening tight junctions of retinal microvascular endothelial cells by pericytes under normoxia and hypoxia involving angiopoietin-1 signal way // *Eye (Lond).* – 2007. – Vol. 21. – N. 12. – P. 1501-1510.
314. Wang-Fischer Y. Manual of stroke models in rats / editor Wang-Fischer Y. // Boca Raton. – CRC Press. – 2009. – 352 p.
315. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis // *Ann Neurol.* – 1985. – Vol. 17. – N. 5. – P. 497-504.
316. Wei W., Schwaid A.G., Wang X., Wang X., Chen S., Chu Q. et al. Ligand Activation of ERR α by Cholesterol Mediates Statin and Bisphosphonate Effects // *Cell Metab.* -2016. – Vol. 23. – N. 3. – P. 479–491. [doi:10.1016/j.cmet.2015.12.010](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.010).
317. Weinstein P.R., Hong S., Sharp F.R. Molecular identification of the ischemic penumbra // *Stroke.* - 2004. – V. 35. P. 2666-2670.

318. Wenz T. Mitochondria and PGC-1 α in Aging and Age-Associated Diseases // Journal of Aging Research. – 2011. - Article ID 810619. - 12 p. doi:10.4061/2011/810619
319. Wenz T. PGC-1 α activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. IUBMB Life // 2009. – Vol. 6. – P. 1051–1062.
320. Whitaker R.M., Wills L.P., Stallons L.J., Schnellmann R.G. cGMP-selective phosphodiesterase inhibitors stimulate mitochondrial biogenesis and promote recovery from acute kidney injury // J Pharmacol. Exp. Ther. - 2013. – Vol. 347. – P. 626–634. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.113.208017>
321. Wilkins H., Harris J.L., Carl S.M., Lu J., Selfridge J. E., Roy N. et al. Oxaloacetate activates brain mitochondrial biogenesis, enhances the insulin pathway, reduces inflammation and stimulates neurogenesis // Human Molecular Genetics. – 2014. – Vol. 23. – N. 24. – P. 6528–6541. doi:10.1093/hmg/ddu371
322. Wills L.P., Trager R.E., Beeson G.C., Lindsey C.C., Peterson Y.K., Beeson C.C., Schnellmann R.G. The β_2 -adrenoceptor agonist formoterol stimulates mitochondrial biogenesis. J Pharmacol. Exp. Ther. – 2012. – Vol. 342. – P.106–118.
323. Windle V., Szymanska A., Granter-Button S., White C., Buist R., Peeling J., Corbett D. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat // Exp Neurol. – 2006. – Vol. 201. – N. 2. – P. 324-334.
324. Winge D.R. Sealing the mitochondrial respirasome // Molecular and Cellular Biology. - 2012. - V. 32. - N 14. - P. 2647–2652.
325. Won S.J., Kim D.Y., Gwag B.J. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death // Journal of Biochemistry and Molecular Biology. – 2002. Vol. 35. P. 67-86.
326. Wood P. L. Differential regulation of IL-1 α and TNF α release from immortalized murine microglia (BV-2) / P. L. Wood // Life Sci. - 1994. - Vol. 55. -N. 9. - P. 666-668.

327. Woodruff T.M., Thundyil J., Tang SC. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke // *Mol Neurodegeneration*. – 2011. – Vol. 6. – P. 11. doi:10.1186/1750-1326-6-11
328. Woolsey T.A., Rovainen C.M., Cox S.B., Henegar M.H., Liang G.E., Liu D.Q. et al. Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: Response elements for imaging the brain // *Cerebral Cortex*. – 1996. Vol. 6. – P. 647-660
329. Xie Y., Li J., Fan G., Qi S., Li B. Reperfusion promotes mitochondrial biogenesis following focal cerebral ischemia in rats // *PLoS ONE*. – 2014. Vol. 9. – N. 3. – P. e92443. DOI: 10.1371/journal.pone.0092443
330. Xu S., Lu J., Shao A., Zhang J.H., Zhang J. Glial cells: role of the immune response in ischemic stroke // *Front Immunol*. – 2020. – Vol. 11. - P.294.
331. Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M., Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. – 2018. Vol. 10. – N. 1618. P. 1-23. doi:10.3390/nu10111618
332. Yamamoto E., Tamamaki N., Nakamura T., Kataoka K., Tokutomi Y., Dong Y.F. et al. Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation // *Stroke* 2008. – Vol. 39. – P. 3049-3056.
333. Yang J., Vitery M.D., Chen J., Osei-Owusu J., Chu J., Qiu Z. Glutamate-releasing SWELL1 channel in astrocytes modulates synaptic transmission and promotes brain damage in stroke // *Neuron*. – 2019. – Vol. 102. N. 4. – P. 813-827.
334. Yang J.L., Mukda S., Chena S.D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke // *Redox Biology*. – 2018. – Vol. 16. – P. 263–275.
335. Yilmaz G., Arumugam T.V., Stokes K.Y., Granger D.N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke // *Circulation*. – 2006. – Vol. 113. – P. 2105-2112.
336. Yilmaz G., Granger D.N. Leukocyte Recruitment and Ischemic Brain Injury // *Neuromolecular Medicine*. – 2010. – Vol. 12. – P. 193-204.

337. Yin W., Signore A.P., Iwai M., Cao G., Gao Y., Chen J. Rapidly increased neuronal mitochondrial biogenesis after hypoxic-ischemic brain injury // *Stroke*. – 2008. – Vol. 39. – N. – P. 3057-3063. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.520114
338. Zhang H., Gao P., Fukuda R., Kumar G., Krishnamachary B., Zeller K.I. et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity // *Cancer Cell*. – 2007. – Vol. 11. – P. 407–420.
339. Zhou G., Myers R., Li Y. et al. Role of AMPK-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108. – P. 1167–1174.
340. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders // *Nat Rev Neurosci.* – 2011. Vol. 12. – N. 12. – P. 723-738.
341. Zonta M., Angulo M.C., Gobbo S. et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation // *Nat Neurosci.* – 2003. – Vol. 6. – N. 1. – P. 43-50.
342. Zorova L.D., Popkova V.A., Plotnikova E.Y., Silacheva D.N., Pevzner I.B., Jankauskas S.S. et al. Mitochondrial membrane potential // *Anal Biochem.* -2018. – Vol. 552. – P.50–59. doi:10.1016/j.ab.2017.07.009