

**ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ МХИТАРА ГЕРАЦИ**

**АФРИКЯН ШУШАНИК ГЕВОРКОВНА**

**ВЛИЯНИЕ НООПЕПТА НА ЦЕРЕБРАЛЬНУЮ ГЕМОДИНАМИКУ И  
НЕЙРОПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ИШЕМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ МОЗГА**

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук  
по специальности «фармацевтика» 15.00.01

научный руководитель: доктор фармацевтических наук,  
профессор, Баласанян Марине Гарниковна

ЕРЕВАН 2015

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b>	<b>5</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы</b>	
1.1 Особенности терапии ишемических повреждений мозга.	9
1.2 Основные мишени и средства, применяемые для фармакологической коррекции ишемических нарушений.	12
1.3 Роль пептидов в терапии цереброваскулярных заболеваний.	17
1.4 Ноопепт – новый оригинальный ноотропный препарат на основе дизайна коротких пептидов.	27
<b>Глава 2. Материал и методы исследования</b>	
2.1. Моделирование локальной ишемии мозга, вызванной перевязкой средней мозговой артерии.	35
2.2 Моделирование нарушений мозгового кровообращения.	38
2.3 Исследование локального мозгового кровотока крыс методом лазерной доплеровской флоуметрии.	39
2.4 Определение системного артериального давления крыс не инвазивным методом «tail-cuff».	41
2.5 Исследование поведения животных в тесте «Открытое поле».	43
2.6 Определение координации животных на вращающемся стержне.	44
2.7 Исследование обучения и памяти животных в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ).	45
2.8 Исследование поведения животных в тесте «Приподнятого крестообразного лабиринта».	46
2.9 Количественное определение липофусцина в мозговой ткани крыс флуоресцентным методом.	47
2.10 Исследование морфофункционального состояния микроциркуляторного русла головного мозга крыс.	48
2.11 Морфологическое исследование головного мозга крыс.	50

2.12 Статистическая обработка данных.	51
<b>Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение</b>	
<b>3.1 Влияние ноопепта на кровоснабжение мозга.</b>	<b>52</b>
3.1.1 Оценка влияния ноопепта на локальный мозговой кровоток в условиях нарушения кровоснабжения мозга .	53
3.1.2 Исследование влияния ноопепта на системное артериальное давление и ЧСС.	58
3.1.3 Влияние ноопепта на морфофункциональное состояние капиллярной системы головного мозга крыс в условиях нарушения кровоснабжения.	60
<b>3.2 Ноопепт в предотвращении нейроповеденческих последствий локально-ишемических нарушений мозга.</b>	<b>69</b>
3.2.1 Влияние ноопепта на поведение крыс в тесте «открытое поле».	70
3.2.2 Влияние ноопепта на поведение крыс в тесте «приподнятого крестообразного лабиринта».	76
3.2.3 Влияния ноопепта на нарушения координации движений, вызванные локальной ишемией.	82
3.2.4. Антиамнестический эффект ноопепта при ОСМА.	86
<b>3.3 Количественные изменения липофусцина в условиях локально-ишемических нарушений мозга под влиянием ноопепта.</b>	<b>91</b>
<b>3.4 Оценка влияния ноопепта на морфологические изменения, вызванные локально ишемическими нарушениями мозга.</b>	<b>100</b>
<b>Заключение.</b>	<b>107</b>
<b>Выводы.</b>	<b>114</b>
<b>Список литературы.</b>	<b>115</b>

## Список сокращений

- AMPA—  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
- G-2mPE—глицин-2-метил-пролил-глутамат
- GPE—глицин-пролин-глутамат
- NMDA—N-метил-D-аспартат
- PAC1—прокаспаза активирующий фактор-1
- PACAP—гипофизарный аденилатциклаза-активирующий полипептид
- PRP— обогащенный пролином полипептид
- tPA – тканевой активатор плазминогена
- VIP— вазоактивный интестинальный полипептид
- VPAC—рецептор вазоактивного интестинального полипептида
- АД —артериальное давление; САД —систолическое АД, ДАД— диастолическое АД
- АКТГ—адренкортикотропный гормон
- ДА—двигательная активность; О-общая; П-периферическая; В-вертикальная; Ц-центральная
- ИФ—интенсивность флюоресценции
- ИФР—1-инсулиноподобный фактор роста-1
- КАД, КАГ — количество актов Д-дефекации, Г-груминга
- ЛВУ— латентное время удерживания
- МК— мозговой кровоток; ЛМК—локальный МК
- ОП—открытое поле
- ОПСА—окклюзия правой сонной артерии
- ОР, ЗР — открытые и закрытые рукава
- ОСМА—окклюзия средней мозговой артерии (СМА)
- ПКЛ—приподнятый крестообразный лабиринт
- ТРГ— тиреотропный релизинг гормон
- УРПИ, УРАИ—условный рефлекс П—пассивного; А—активного избегания
- ФМА—феномен межполушарной асимметрии
- ЦНС—центральная нервная система
- ЧСС—частота сердечных сокращений

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Разработка средств профилактики и фармакологической коррекции нарушений мозгового кровообращения и, развиваемых при этом патологических последствий, является важной задачей современной медицины как в связи со значительной распространенностью церебрального инсульта, так и высоким процентом смертности и инвалидизации населения при этом заболевании (Мельникова Е.В., 2007; Sacco R. L. et al., 2013; WHO Global Infobase 2015). Эпидемиологические исследования последних лет показали, что среди всех видов инсультов, доминируют ишемические поражения мозга, доля которых, по данным различных международных мультицентровых исследований достигает 87% (Go A.S. et al., 2013).

Изучение тонких механизмов, лежащих в основе развития ишемических нарушений с участием кальций-глутаматной нейротоксичности, глутаматных транспортных белков и рецепторов (Fisher M. and Schaebitz W., 2000; Onwuekwe I.O. and Ezeala-Adikaibe B., 2012; Lai T.W. et al., 2014), а также ГАМК-глутаматного дисбаланса, ферментов, ответственных за генерацию супероксид радикала и других реактивных форм кислорода (Seth L., 1999; Manzanero S. et al., 2013), каспаза-3 и т.д. (Yakovlev A.G. and Faden A.I., 2004), предопределили основные подходы в терапии ишемических нарушений мозга. Они включают применение блокаторов кальциевых каналов, NMDA рецепторов, ГАМК-ергических средств, сквенджеров свободных радикалов, антиоксидантов (Woodruff T.M. et al., 2011; Terasaki Y. et al., 2014), действие которых направленно на восстановление и поддержание на необходимом уровне адекватного кровоснабжения мозговой ткани (Arshad M., 2014), уменьшение объема зоны инфаркта, а также на коррекцию психоневрологических последствий локально-ишемических поражений мозга (Zhang L. et al., 2012).

Несмотря на довольно обширный арсенал исследованных за последние десятилетия соединений, выбор средств, применяемых для лечения и профилактики ишемических нарушений, продолжает оставаться ограниченным (Sandercock P. et al., 2002; Hinkle J.L. and Bowman L., 2003; Ginsberg M.D., 2009; Kaur H. et al., 2013), в связи с отсутствием

окончательно доказанной клинической эффективности апробированных соединений (Gladstone J.D. et al., 2002; Philip M. et al., 2009; Kahle M.P. and Bix G.J., 2012; Minnerup J. et al., 2012).

В последнее время значительно возрос интерес к эндогенным пептидам и их аналогам в качестве потенциальных терапевтических средств. Предпосылкой для изучения возможности применения нейропептидов при нейродегенеративных заболеваниях и повреждениях мозга различного генеза, включая ишемические нарушения мозга, послужила их ключевая роль в регуляции функций центральной нервной системы (Hökfelt T. et al., 2003; McGonigle P., 2012). Физиологическая активность нейропептидов разнонаправлена, поскольку, в виду наличия в структуре этих соединений нескольких лигандных групп связывания, для них характерна афинность к различным специфическим рецепторам (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001). Более того, нейропептидам свойственна биотрансформация с образованием родственных организму нетоксичных метаболитов, нередко обладающих собственной биологической активностью. Многообразие активируемых пептидами рецепторов, а также наличие каскадных механизмов, послужили предпосылкой для создания на их основе препаратов, применяемых в терапии различных нарушений ЦНС, в том числе и, ишемических повреждений (McGonigle P., 2012; Cervia, 2013).

Однако, эндогенным пептидам и их аналогам присущ ряд недостатков, ограничивающих их применение в клинике (Hoyer D., Bartfai T., 2012). Во-первых, большинство из них имеют короткую продолжительность действия (от нескольких минут, до нескольких часов) вследствие энзиматического расщепления как специфическими, так и неспецифическими пептидазами (Kimmerlin T. and Seebach D., 2005). Во-вторых, полипептиды обладают низкой биодоступностью при пероральном применении и плохо проникают через гемато-энцефалический барьер (Wu D., 2005). Более того, эндогенные нейропептиды и их аналоги, взаимодействуя с различными подтипами рецепторов как в ЦНС, так и на периферии, могут приводить к развитию нежелательных побочных эффектов.

В свете вышеизложенного, в последнее время, все большую значимость в качестве эффективных потенциальных нейропротекторов приобретают короткие ди- и три-пептиды, имитирующие концевые остатки эндогенных полипептидов: вазопрессина, АКТГ, ТРГ, ИФР-1

и т.д., (Rajanikant G.K. et al., 2007; Manaeko A. et al., 2011; Hori M. et al., 2012), содержащие циклические аминокислоты пролин и пироглутаминовую кислоту, а также глицин (Samonina G., et al., 2002). Последние, наряду со свойственной для пептидов способностью метаболизироваться с образованием соединений, нередко обладающих собственной фармакологической активностью, в отличие от своих более длинных аналогов, характеризуются высокой биодоступностью, так как не подвергаются действию неспецифических пептидаз и, хорошо проникают через ГЭБ (Островская Р.У. и соавт., 2004; Guan J. and Gluckman P., 2009).

Вышеизложенное послужило основой для исследования нейропротекторной способности созданного в НИИ Фармакологии РАМН на основе дизайна коротких пептидов ноотропного препарата—ноопепта (этиловый эфир N-фенацетил-L-пролилглицина). (Островская Р.У. и соавт., 2002).

### **Цель и задачи исследования**

Целью исследования явилось изучение влияния ноопепта на церебральную гемодинамику и его способности устранять нейроповеденческие последствия локально-ишемических нарушений мозга. Поставленная цель была достигнута исследованием влияния ноопепта на:

- локальный мозговой кровоток в условиях односторонней перевязки общей сонной артерии (ОПСА),
- микроциркуляторное русло коры головного мозга при нарушениях церебральной гемодинамики, вызванных ОПСА,
- системное артериальное давление и ЧСС экспериментальных животных,
- процессы обучения и памяти при локально ишемических нарушениях мозга,
- изменения поведенческих реакций животных, вызванных окклюзией средней мозговой артерии,
- уровень липофусцина в ишемизированной мозговой ткани крыс,

- морфологические сдвиги в мозговой ткани, вызванные локальной ишемией.

### **Научная новизна**

Выявлена способность ноопепта стимулировать нарушенное, в условиях ишемии, кровоснабжение мозга, путем усиления локального мозгового кровотока и улучшения состояния микроциркуляторного русла коры головного мозга, без значимых изменений со стороны системного артериального давления и частоты сердечных сокращений у экспериментальных животных.

Установлено, что введение ноопепта на фоне локально-ишемических поражений мозга, устраняет нарушения памяти и процессов обучения, а также развитие тревожности, подавление локомоторной активности и координации животных, вызванных окклюзией средней мозговой артерии.

Раскрыт один из возможных механизмов нейропротекторного действия ноопепта, обусловленный способностью препарата предотвращать свойственное ишемии избыточное накопление липофусцина как в поврежденном, так и интактном полушариях головного мозга ишемизированных животных.

### **Научно-практическая значимость**

Полученные данные относительно способности ноопепта устранять нарушения кровоснабжения мозга и улучшать микроциркуляцию в условиях ишемических поражений, открывают перспективы для разработки препарата в качестве нового средства коррекции нарушений мозгового кровообращения.

Доказанная в эксперименте эффективность ноопепта в устранении тревожности и нарушений координации, повышении общей двигательной активности и улучшении памяти животных, вызванных ишемическими нарушениями мозга, позволяют рекомендовать препарат в качестве средства для устранения психоневрологических последствий ишемического инсульта.



## Г Л А В А 1.

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. Особенности терапии ишемических повреждений мозга.

До 70-х годов XX столетия в неврологии доминировало представление о том, что при остром нарушении мозгового кровообращения ишемическое повреждение возникает сразу и необратимо (Ginsberg M.D., 2009), в связи с чем терапия инсульта была направлена в основном на сокращение факторов риска (контроль артериального давления, избыточной массы тела, курение и т.д.) и минимизацию вторичных повреждений мозга восстановлением или поддержанием реперфузии. Одним из наиболее значимых достижений в то время стало внедрение инсультных блоков (Stroke Units), которые позволяют снизить летальность и улучшить функциональный исход при остром инсульте примерно на 20 % (Donnan G.A. et al., 2008).

Однако, с тех пор, как был открыт феномен «ишемической полутени» (пенумбры) и сформулировано понятие о «терапевтическом окне», не прекращаются поиски препаратов и методик, способных защитить поврежденные, но еще не погибшие от ишемии нейроны в пределах пенумбры (Moskowitz M.A. et al., 2010; Minnerup J. et al., 2012; Tymiansky M., 2013) M.D. Ginsberg в своей статье «Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future» (2008) отмечает, что только за последние 6 лет появилось около 1000 новых публикаций, посвященных экспериментальным исследованиям в этой области, и свыше 400 клинических работ на эту же тему (Ginsberg M.D. 2008, 2009).

Современные подходы в терапии ишемических нарушений мозгового кровообращения, помимо прочего, включают мероприятия, направленные на адекватное восстановление и поддержание на необходимом уровне кровоснабжения ишемизированной мозговой ткани (реперфузионная терапия) (Woodruff M.T et al., 2011; Arshad M., 2014). В указанном аспекте наибольшим достижением в современной неврологии стало применение тромболитической терапии с использованием рекомбинантного активатора тканевого

плазминогена (tPA, альтеплазы). Он является одним из немногих средств, эффективность которого при лечении ишемических инсультов клинически доказана. Результаты клинических испытаний NINDS и ECASS-III и многочисленные наблюдения в клинической практике свидетельствуют, что при ишемическом инсульте успешной лечебной стратегией для спасения от ишемии угрожаемой ткани мозга и улучшения функционального исхода является внутривенная тромболитическая терапия в первые 4,5 ч от начала заболевания (Hacke W. et al., 2008; Taussky P, et al., 2011). Ранняя реперфузия, проведенная в рамках «терапевтического окна», у множества больных демонстрировала поистине блестящие результаты: нередко, буквально «на игле», обеспечивалось полное восстановление неврологических функций пациента, который ранее был бы обречен на скорую гибель или тяжелую инвалидность (Fisher M., and Schaebitz W., 2000; Hinkle J.L. and Bowman L., 2003). Препаратом выбора при этом является тканевой активатор плазминогена (tPA). Другие тромболитические агенты при этом, на сегодняшний день, не обнаружили своих преимуществ перед tPA. Вместе с тем необходимо помнить, что реперфузионная терапия имеет ряд противопоказаний и, может приводить к серьезным побочным эффектам: развитие кровотечений (Sandercock P. et al., 2002), а также очень небольшой временной интервал для применения - первые 2-3 часа после ишемии (Tymianski M., 2013). Таким образом, реперфузия ишемизированной мозговой ткани, сама по себе, чревата многими осложнениями. Следует особо отметить, что ишемия мозга провоцирует сложные каскадные процессы, такие как воспаление, эксайтотоксичность, окислительный стресс, апоптоз, формирование отека (вследствие повреждения гемато-энцефалического барьера), усугубляющие патологические процессы происходящие не только в острой стадии инсульта, но и приводящие к отсроченному повреждению мозговой ткани даже в условиях полного восстановления кровоснабжения (Moskowitz M.A. et al., 2010). В данном аспекте очевидным является тот факт, что, начиная с первых часов развития ишемических нарушений, реперфузионную терапию необходимо сочетать с применением лекарственных препаратов, действие которых направлено на защиту тканей мозга. Кроме того, по целому ряду причин (короткое временное окно, большое количество противопоказаний, необходимость наличия соответствующих специализированных отделений и подготовленного персонала и т.д.),

реперфузионная терапия применима далеко не для всех пациентов с ишемическим инсультом (Tymianski M., 2013), и, в этом случае, единственной альтернативой остается фармакологическая коррекция постишемических нарушений лекарственными препаратами, способствующими адекватному восстановлению кровоснабжения, и обладающими нейропротекторными свойствами.

Несмотря на то, что история поиска и создания нейропротекторов насчитывает уже не одно десятилетие, выбор средств с доказаной клинической эффективностью для лечения и профилактики ишемических нарушений мозга более чем ограничен. Достаточно отметить, что за истекший период, в около 114-ти клинических исследованиях было изучено более чем 50 препаратов с нейропротекторной активностью, однако, клиническая эффективность большинства из них так и не была подтверждена (Gladstone D.J. et al., 2002).

Есть множество объективных и субъективных причин, объясняющих провал клинических исследований большинства веществ, демонстрирующих высокую эффективность в экспериментальных исследованиях (Dirnagl U., 2006). Среди них можно отметить: *временной интервал введения препарата* – в экспериментах происходит непосредственно, или даже, до эпизода ишемии, в то время как в клинических исследованиях, он колеблется в пределах от 4-х до 12-ти часов; *недостаточная селекция пациентов в клинических исследованиях*, тогда как экспериментальные модели воспроизводят строго определенный вид ишемического повреждения; *способ оценки эффективности терапии* – в экспериментальных исследованиях чаще оценивают размеры очага поражения и морфологические характеристики, а в клинике проводится неврологическая и/или функциональная оценка состояния больных и т. д. (Gladstone D.J. et al., 2002). Тем не менее, ряд авторов полагает, что одной из основных причин низкой эффективности многих соединений в клинике является то, что инсульт поражает не только нейроны, но и остальные элементы нейроваскулярного звена (Terasaki et al., 2014). Межклеточные взаимодействия между нейронами, глией (астроцитами, микроглией и олигодендроцитами), сосудистыми элементами (эндотелиальные клетки, перициты и гладкомышечные клетки) и межклеточным матриксом лежат в основе поддержания общего гомеостаза ЦНС. Для передачи сигналов важную роль играют такие эндогенные соединения как цитокины, факторы роста, хемокины

и т.д. Любое нарушение в указанном взаимодействии может привести к дисфункции нейроваскулярного звена при различных нейродегенеративных заболеваниях, включая ишемию. С указанной точки зрения, терапия инсульта должна быть направлена не только на нейропротекцию, но и на защиту всех клеточных элементов, а также восстановление функции всего нейроваскулярного звена (Fagan S.C. et al., 2004; Moskowitz M.A., et al., 2010).

## **1.2. Основные мишени и средства, применяемые для фармакологической коррекции ишемических нарушений.**

Значительные достижения в молекулярной и клеточной биологии последних лет привели к выявлению множества, как потенциальных механизмов развития, так и мишеней для фармакологической коррекции ишемического инсульта. В отличие от более ранних предположений, согласно которым ишемические нарушения мозга рассматривались как пассивный процесс уменьшения поставки кислорода нейронам и другим клеткам ЦНС, современные представления, базируются на знании того, что большая часть повреждений опосредована активными механизмами, вовлеченными в процесс формирования очага некроза и поврежденной, но, все еще жизнеспособной, зоны “пенумбры” – мишени для терапевтического воздействия средств, применяемых для коррекции психоневрологических последствий инсульта (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001). К активным механизмам относятся: энергетический дефицит, нарушение ионного гомеостаза, ацидоз, увеличение содержания внутриклеточного кальция, эксайтотоксичность, активация свободно-радикальных процессов, генерация продуктов биотрансформации арахидоновой кислоты, цитокин опосредованная цитотоксичность, активация комплемента, нарушение целостности гематоэнцефалического барьера, активация глиальных клеток и инфильтрация лейкоцитов (Woodruff T. M. et al., 2011). В процессе повреждение мозга при ишемии вовлечены глутамат и его транспортные белки, NMDA (а также AMPA и KA) рецепторы, NO-синтаза и некоторые другие ферменты ответственные за генерацию супероксид радикала и других реактивных форм кислорода (Adibhatla R.M. et al., 2003), каспаза-3 и т.д. Все это еще раз

подчеркивает необходимость наличия у потенциального нейропротектора многокомпонентного механизма действия, для достижения желаемой эффективности при лечении ишемических нарушений. Стратегия поиска и создания новых эффективных нейропротекторов велась по нескольким основным направлениям: антагонисты глутамата, агонисты ГАМК, антагонисты кальция, антиоксиданты/скавенджеры свободных радикалов, а также прекурсоры фосфолипидов, регуляторы NO и т.д.

### **Антагонисты глутамата.**

Глутамат, один из основных нейротрансмиттеров, участвует в цитотоксическом повреждении нейронов и белого вещества (Arundine M, Tymianski M. 2004; Bakiri Y. et al., 2008). Нейропротекторы, действие которых направлено против него, включают в себя антагонисты NMDA- и AMPA-рецепторов (Bruno V. et al., 2001).

*Антагонисты NMDA рецепторов* были первыми нейропротективными препаратами, которые в экспериментальных условиях значительно (на 40—70 %) ограничивали область инфаркта мозга, прежде всего за счет сохранения живой зоны «ишемической полутени». Неконкурентные антагонисты NMDA рецепторов (декстрорфан, дизолципин, кетамин, аптиганел и т.д), в экспериментальных условиях, проявили значимый нейропротективный эффект: достоверно сокращая размеры инфарктных изменений при фокальной ишемии мозга. Позитивное действие препаратов демонстрировалось на различных экспериментальных моделях, а также, при разных схемах введения (до экспериментального инсульта, и, в меньшей степени, после его индукции). Однако, клинические испытания вышеуказанных препаратов были прекращены из-за широкого спектра серьезных побочных действий (каталепсия, локомоторные нарушения, транзиторная артериальная гипотония, дозо-зависимые нарушения сознания, нистагм, галлюцинации и т.д.) (Lai T.W. et al., 2014). Единственным антагонистом NMDA-рецепторов, достигшим этапа крупных клинических исследований, явился аптиганел, однако его исследование на 2/3—й фазе было прекращено в связи с отсутствием эффективности и увеличением смертности в группе (Albers G.W. et al., 2001; Kaur et al., 2013). К неконкурентным антагонистам NMDA рецепторов можно отнести

также ионы магния (хотя для них характерно несколько механизмов действия), демонстрирующие антиэксайтотоксический эффект: они способны подавлять высвобождение глутамата, а также вступать с ним в неконкурентный антагонизм на уровне NMDA рецепторов (Muir K.W et al., 2004; Onwuekwe I.O. and Ezeala-Adikaibe B., 2012). Ионы магния также вступает в антагонизм с ионами кальция, как на уровне мембранных каналов, так и внутри клетки. Повышенное содержание внутриклеточного магния приводит к повышенной буферизации кальция внутри митохондрий, а также препятствует истощению клеточных запасов АТФ. Применение магний сульфата в ряде экспериментальных работ на животных привело к снижению объема некроза при моделированном инфаркте мозга на 25-65%. Кроме того, в работах Горбачева и соавт., было показано выраженное нейропротекторное действие композиционной лекарственной формы “Магнелонг”, в состав которой входит хлорид магния, на модели необратимой перевязки общих сонных артерий (Горбачев С.В. и соавт., 2007). Однако, результаты последнего испытания эффективности магнезия при ишемическом инсульте, не подтвердили вышеуказанное действие. В исследованиях включающих 90 пациентов с ишемическим инсультом, не были выявлены достоверные сокращения размеров инфаркта по сравнению с группой плацебо (Kidwell C.S. et al., 2009).

***Конкурентные антагонисты NMDA рецепторов.*** Из конкурентных антагонистов NMDA рецепторов наиболее детально был изучен селфотел. Однако, клиническое исследование безопасности и дозозависимой эффективности селфотела показало, что его применение в первые 12 ч. после развития ишемического инсульта сопровождается проявлением таких побочных эффектов, как двигательное беспокойство, галлюцинации, спутанность сознания, паранойя, делирий и т.д. (Hoyle L. et al., 2004). Таким образом, доклинические экспериментальные исследования на животных разных видов продемонстрировали выраженные нейропротекторные эффекты как конкурентных, так и неконкурентных антагонистов NMDA рецепторов в виде достоверного и значительного уменьшения размеров зоны инфаркта в ткани мозга. К сожалению, применение большинства из них в клинике оказалось невозможным из-за широкого спектра тяжелых побочных эффектов. Побочные эффекты некоторых препаратов развивались при использовании малых и

средних доз, до достижения в плазме крови уровня, достаточного для оказания нейропротекторного действия.

***Селективные блокаторы NMDA рецепторов.*** Учитывая высокую токсичность блокаторов основных NMDA рецепторных сайтов (глутаматного и фенциклидинового), были также предприняты попытки селективной блокады NMDA рецепторов путем воздействия на их модуляторные (полиаминовые и глициновые) сайты (глицин, элипродил, дизолципин и т.д) (Bakiri Y. et al., 2008). Но, к сожалению, использование вышеуказанных, менее токсичных низкоаффинных и селективных антагонистов NMDA рецепторов оказалось мало эффективным (Wang C.X., 2005).

***Блокаторы AMPA глутаматных рецепторов.*** Доказательства участия AMPA глутаматных рецепторов в развитии «эксайтотоксичности» и повреждающем действии ишемии явились основанием для их использования в качестве дополнительной терапевтической мишени. Антагонисты AMPA рецепторов –PNQX, NBQX и ZK200775 при экспериментальной фокальной ишемии мозга проявили выраженные нейропротективные свойства (Montero M. et al., 2007). В то же время были выявлены грубые побочные эффекты этих препаратов в виде нефротоксичности (NBQX) и, выраженной седации (ZK200775), что делает их неприменимыми в клинических условиях (Small D.L. et al., 1998). Таким образом, клинические испытания большинства наиболее сильных в эксперименте нейропротекторов — антагонистов глутаматных рецепторов были прекращены из-за широкого спектра серьезных побочных явлений. Использование менее токсичных низкоаффинных и селективных антагонистов NMDA рецепторов оказалось мало эффективным. Принимая во внимание широкую распространенность глутаматных рецепторов в ЦНС и их значимость для осуществления множества физиологических функций мозга, закономерно, что эффективность нейропротекции, осуществляемой путем блокады глутаматных рецепторов, находится в прямой корреляционной связи с количеством и тяжестью побочных ее эффектов, что ставит под сомнение обоснованность данной терапевтической стратегии.

***Ингибиторы синтеза и пресинаптического высвобождения глутамата.*** Высокая токсичность антагонистов глутаматных рецепторов обусловила поиск других эффективных методов уменьшения глутаматной «эксайтотоксичности». Новой стратегией

нейропротекции явилось торможение синтеза и пресинаптического высвобождения глутамата, приводящее к уменьшению выраженности постсинаптической «эксайтотоксичности». Однако, эти препараты не имели достаточной клинической эффективности и безопасности (Diener H.C. et al., 2000).

### **Антагонисты потенциалзависимых кальциевых каналов**

Кальций-индуцированная токсичность была открыта в конце 70-х годов. Концепция «кальциевой гибели клетки» при церебральной ишемии быстро получила широкое распространение и, до настоящего времени (Hofmeijer J., van Putten M.J., 2012), механизм внутриклеточного накопления кальция считается ключевым в пато-биохимическом ишемическом каскаде. В связи с этим, первой обоснованной стратегией нейропротекции стала разработка антагонистов потенциал-зависимых кальциевых каналов. С 80-х годов были проведены около 600 рандомизированных плацебо-контролируемых исследований ингибиторов потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа— дигидропиридинов (Ginsberg M.D., 2008).

Проведенные экспериментальные исследования, подтвердили нейропротекторное свойство и положительное действие антагонистов кальция на мозговой кровоток (Ito Y. Araki N., 2010). Клинические наблюдения показали, что антагонисты кальция тормозят поступление ионов кальция внутрь клетки, восстанавливая тем самым ее метаболизм и, устраняя действие вазоконстрикторных факторов (тромбоцитарной, лейкоцитарной и пептидной природы) в зоне постишемического сокращения сосудов. Благодаря этому уменьшается число смертельных исходов заболевания (Schurg A., 2004). Однако, обзор клинических испытаний антагонистов потенциал-зависимых кальциевых каналов, проведенных у больных с острым ишемическим инсультом, свидетельствует об отсутствии у препаратов этой группы значимых нейропротекторных свойств. В настоящее время это представляется закономерным, так как было установлено, что внутриклеточное накопление кальция — сложный процесс, в основе которого лежат разные механизмы, и только один из них опосредуется через потенциал-зависимые кальциевые каналы. Побочные эффекты



препаратов, связанные с их вазодилатирующими свойствами и преходящей артериальной гипотонией – ограничивает их применение в первые часы острой фокальной ишемии мозга (Pliott W.J, Bandari A. 2005)

Что касается остальных групп препаратов: агонисты ГАМК, антиоксиданты, скавенджеры свободных радикалов, и т.д., то и в этом случае эффективность большинства из них так и не подтвердилась клиническими исследованиями, или же – полученные данные были противоречивы.

### **1.3. Роль пептидов в терапии цереброваскулярных заболеваний.**

В последнее время значительно возрос интерес к соединениям пептидной природы в качестве потенциальных терапевтических средств. Достаточно отметить, что на сегодняшний день в клинике, для лечения различных заболеваний применяется около 70 лекарственных препаратов пептидной природы, и около 150 соединений находятся в стадии клинических исследований. Тому есть довольно много объективных причин, главной из которых является участие указанных соединений во многих процессах в организме и их роль в поддержании гомеостаза (Hökfelt T. et al., 2000, Samonina et.al., 2001, McGonigle P., 2012). Регуляция различных процессов пептидами осуществляется при помощи специфических рецепторов, локализованных преимущественно на плазматической мембране клеток. Примечательным является то, что в большинстве случаев, для одного и того же пептида, характерно наличие нескольких рецепторов (Hoyer D., Bartfai T., 2012).

В качестве предшественников, для создания эффективных лекарственных средств, пептиды имеют ряд преимуществ. Во-первых, благодаря своей особенной структуре они осуществляют очень специфическую и сложную модуляторную функцию. Во-вторых, они в основном проявляют высокую специфичность и минимальную перекрестную реактивность к своим рецепторам мишеням (Cervia D. and Gasini G. 2013). Более того, в отличие от многих синтетических терапевтических средств, они не обладают способностью накапливаться в тканях, легко метаболизируются с участием эндогенных пептидаз, не оставляют токсического действия на организм и не вызывают лекарственного взаимодействия. Синтез

осуществляется легко, однако, затраты связанные с их производством, довольно значительны (McGonigle P., 2012).

С другой стороны, эндогенные пептиды и их аналоги имеют ряд недостатков, ограничивающих их применение в клинике. В частности, у них короткий период полувыведения, продолжительностью от нескольких минут до нескольких часов, вследствие ускоренного почечного клиренса и/или энзиматического расщепления протеазами в крови, почках или печени. Возможно, модификация структуры пептидов может некоторым образом решить эту проблему (Hoyer D., Bartfai T., 2012). Еще одним недостатком препаратов пептидной природы является невозможность их перорального применения из-за плохой абсорбции последних из желудочно-кишечного тракта. Для средств, предназначенных для лечения заболеваний ЦНС, еще одним существенным недостатком является плохая проницаемость через гематоэнцефалический барьер, в том случае, если в организме отсутствуют специальные системы для их транспортировки (Hökfelt T. et al., 2003; McGonigle P., 2012).

Наиболее перспективным направлением для создания новых препаратов в терапевтических целях, используемых также при заболеваниях ЦНС, является создание коротких аналогов олигопептидов, в частности ди- и три- пептидов, как эндогенных предшественников агонистов пептидэргических рецепторов (Островская Р.У. и соавт., 2006). Создание таких аналогов позволяет решить практически все проблемы, связанные с вышеперечисленными недостатками эндогенных соединений. В первую очередь указанный подход обеспечивает высокую энзиматическую стабильность и биодоступность при пероральном приеме, а также возможность проникновения препарата в ЦНС через гематоэнцефалический барьер. Во-вторых, создается возможность получить необходимые для агонистического действия на определенные рецепторы стерические параметры молекулы, что существенно снижает количество побочных эффектов путем повышения селективности к определенному виду рецепторов. С другой стороны, короткие аналоги, обладая указанными преимуществами перед молекулами предшественниками, тем не менее, сохраняют способность к безопасной биотрансформации и, относительно менее токсичны, чем соединения непептидной природы.

Многочисленные научные исследования последних десятилетий, посвященные изучению роли эндогенных нейропептидов (АКТГ, нейропептид Y, вазоактивный интестинальный полипептид, гипофизарный аденилатциклаза активирующий нейропептид, субстанция P, вазопрессин, инсулиноподобный фактор роста-1 и др.) и родственных им соединений, доказали их ключевую роль в нормальном функционировании ЦНС (Hökfelt T. et al., 2000; Cervia D. 2013). На сегодняшний день доказано, что эти соединения играют важную роль в регуляции общего мозгового кровотока, нейропротекции и ауторегуляции при гипоксии (Edvinson L., Krause D. N., 2000). Есть данные, позволяющие считать, что вазопрессин и АКТГ, а также, в некоторой степени и вещество P, тиролиберин, нейропептид Y и др. являются эндогенными регуляторами процессов памяти (Гусев Е.И., Скворцова В.И. 2001). Кроме того, для пептидов глипролинового (глицин-пролин) семейства выявлено характерное влияние на процессы памяти (Samonina G. et al., 2002).

Многообразие пептидергических рецепторов, а также активируемые ими цепные каскадные механизмы, являются многообещающей предпосылкой для создания препаратов, применяемых в терапии различных нарушений ЦНС (Strand F.L. 2003; Cervia D., 2013).

***Гипофизарный аденилатциклаза-активирующий полипептид.*** Есть данные о наличии у PACAP выраженных нейротрофических и нейропротекторных свойств (Hori M. et al., 2012). Нейропротекторные свойства указанного соединения, показанные не только *in vitro*, но и *in vivo*, основаны на его способности предотвращать нейрональный апоптоз как непосредственным влиянием на нейрональные клетки, так и опосредовано, путем стимуляции выброса нейропротекторных факторов астроцитами (Ohtaki H. et al., 2006; Nakamachi T. et al., 2012). Известно, что подобная биологическая активность пептида опосредуется активацией PAC1 рецепторов, которые рассматриваются в качестве потенциальной мишени в лечении различных нейродегенеративных заболеваний. Lazarovici P. и соавторами (2012) показаны многокомпонентные нейропротекторные свойства PACAP38 при кислородно-глюкозной депривации и ОСМА (Lazarovici P. et al., 2012). Несмотря на то, что эндогенный лиганд PAC1 рецепторов - гипофизарный аденилатциклаза-активирующий пептид обладает способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, его применение, в качестве терапевтического средства сопряжено с рядом

трудностей, в частности, с быстрой деградацией при введении. Кроме того, введение PACAP сопровождается развитием периферических эффектов, связанных с активацией VPAC1 и VPAC2 рецепторов (Bourgault S. et al., 2009), что нежелательно.

***Инсулиноподобный фактор роста-1.*** Предпосылкой для изучения нейропротекторных свойств ИФР-1 стали исследования, направленные на изучение эндогенного ответа полипептида при повреждениях мозга (Greenberg D.A. and Jin K., 2006). Было выявлено, что, во-первых, в последующие после гипоксии-ишемии дни, у молодых крыс наблюдается экспрессия мРНК рецепторов для ИФР-1, зависящая от временных характеристик и локализации зоны инфаркта, а во-вторых, ИФР-1 иммуно-гистохимически ассоциируется с реактивной глией (Guan J. and Gluckman P., 2009). Аналогичные данные были получены Lee и Boundy у незрелых и взрослых особей. Полученные результаты дали возможность предположить, что ИФР-1 играет важную роль в качестве нейротрофического фактора при повреждении мозга. Так, например, центральное введение пептида после гипоксии-ишемии у взрослых крыс, также как после ишемии у овечьих эмбрионов, предотвращало повреждение нейронов и белого вещества у экспериментальных животных (Guan et al., 2001). Указанное действие носило доза-зависимый характер, с однозначной куполообразной зависимостью нейрональной выживаемости в последующие 30 минут после церебральной ишемии. Лечение ИФР-1 (3мкг) улучшало соматосенсорную и моторную функцию, определяемую в билатеральном тактильном тесте, а также и долгосрочные гистологические характеристики, определяемые через три недели после повреждения (Guan et al., 2001). Однако, для ИФР-1 характерны недостатки, свойственные пептидам: его проницаемость в центральную нервную систему очень ограничена (Liu X.F. et al., 2001), несмотря на показанную в некоторых исследованиях нейропротекторную активность после системного применения; более того, его потенциальные метаболические и митогенные эффекты ограничивают применение ИФР-1 в клинике.

***GPE — N-терминальный трипептид инсулиноподобного фактора роста-1.*** Открытия дез-(1,3)-ИФР-1 — укороченной формы инсулиноподобного фактора роста, изолированного из мозговой ткани, послужило толчком для исследования различий между нативной формой пептида и его короткими аналогами. Еще один продукт расщепления ИФР-

1 – N-концевой трипептид (GPE-глицин-пролин-глутамат), до конца 80-х считался биологически неактивным побочным продуктом его биотрансформации. Однако открытие кислой протеазы в плазме крови и мозге, в дальнейшем обосновало существование GPE как эндогенного нейроактивного пептида (Yamamoto H. And Murphy L.J., 1999). Биологическая активность этого соединения в культуре клеток была впервые представлена в 1989 г. Оказалось, что синтетический GPE стимулирует высвобождение дофамина и ацетилхолина в культуре срезов мозга, но без взаимодействия с рецепторами инсулиноподобного фактора роста-1 (Guan J. and Gluckman P., 2009). Учитывая тот факт, что GPE является нейроактивным соединением и, возможно, взаимодействует с NMDA-рецепторами, нейропротективный эффект трипептида впервые был изучен на культуре клеток, после NMDA-индуцированного нейронального повреждения (Saura J. et al., 1999). Используя органо-специфические культуры исследователи показали, что GPE доза-зависимым образом защищает нейроны гиппокампа от NMDA-индуцированной нейрональной токсичности. Нейропротекторное свойство трипептида оказалось похоже на аналогичное действие МК801 — неконкурентного блокатора NMDA-рецепторов. Однако несмотря на то, что ранее Bourguignon и соавт. (Bourguignon J.P. and Gerard A., 1999) были показаны NMDA-эффекты трипептида, авторами была опровергнута вероятность NMDA-опосредованного механизма нейропротекторного действия в связи с незначительным связыванием меченного тритием GPE в зубчатой извилине, где NMDA-рецепторы представлены в большом количестве (Saura J. et al., 1999). При исследовании влияния GPE *in vivo* в тех же условиях (ишемия-гипоксия), что и ИФР-1, было установлено, что при центральном введении короткого аналога в количестве, эквивалентном эффективной дозе ИФР-1, через 2 часа после повреждения наблюдается уменьшение выраженности кортикального инфаркта (Guan J. et al., 1999). Положительные сдвиги, как и в случае применения инсулиноподобного фактора роста-1, наблюдались практически во всех исследуемых областях мозга: коре, стриатуме, некоторых подразделениях гиппокампа. Примечательно, что при введении GPE, выраженные изменения были отмечены в СА1-2 области, там, где ИФР-1 никогда не оказывал нейропротекторного действия. Наиболее вероятным объяснением данного феномена может служить низкая плотность рецепторов ИФР-1 в указанной области, что в свою очередь наводит на мысль о

том, что пространственные структурные различия между пептидом и его коротким аналогом приводят к возникновению уникального механизма нейропротекторного действия короткого аналога. Еще одной интересной особенностью GPE является то, что у молодых, неполовозрелых животных нейропротекторные эффекты проявляются лишь при десятикратном увеличении дозы (30 мкг вместо 3 мкг), свидетельствующих о том, что в стадии развития мозга эффекты GPE наименее выражены (Guan J. and Gluckman P.D., 2009). Учитывая размеры GPE меньшие по сравнению с полипептидом, а также тот факт, что трипептид не связывается с рецепторами ИФР-1, становится очевидным, что короткий аналог, как терапевтическое средство лишен большинства недостатков ИФР-1. Тем не менее, поскольку он является эндогенным пептидом его стабильность к ферментативному расщеплению низка. Механизм действия GPE, до сих пор, остается не до конца изученным. Однако, проведенные в течение последних 20 лет исследования могут служить основой для определенных выводов. Во-первых, известно, что GPE не влияет на рецепторы ИФР-1, а это позволяет предположить, что его действие связано с влиянием на NMDA рецепторы. Имея в качестве двух концевых аминокислот глицин и глутамат, он имеет идеальную структуру для связывания, как с глициновым, так и глутаматным сайтом указанных рецепторов. Исследованиями *in vitro* и *in vivo* показана способность ИФР-1 и GPE, но не дез-ИФР-1 (инсулиноподобный фактор роста-1 без концевой фрагмента глицин-пролин-глутамат), оказывать сравнимое с AP-5 (антагонист глутаматных рецепторов) действие на NMDA рецепторы (Bourguignon J. and Gearad A., 1999). Из указанного следует, что влияние GPE опосредованно NMDA рецепторами, а ИФР-1 можно считать про-гормоном GPE. Следует отметить, что антагонистическое влияние ИФР-1 и GPE находятся в зависимости от возраста экспериментальных животных, и наименее выражено у неполовозрелых особей.

Еще одним из возможных механизмов нейропротекторного действия GPE может быть его способность влиять на каспаза-3-зависимый и каспаза-3-независимый пути нейрональной клеточной смерти. Как было показано, введение GPE в течение 1-5 часов после ишемии приводит к значительному уменьшению повреждения нервной ткани, опосредовано через ингибирование процессов, как некроза, так и апоптоза (Guan J. et al., 2004).

Выявлено также, что терапия GPE-м приводит к угнетению пролиферации микроглии, и, полностью предотвращало потерю астроцитов, наблюдаемых на фоне гипоксии-ишемии. Астроциты, как известно, играют важную физиологическую роль в регуляции целостности ГЭБ, межклеточном взаимодействии, пластичности нейронов и нейротрофике путем регуляции метаболизма факторов роста (Persidsky Y. et al., 2006). В физиологических условиях, выделение возбуждающих аминокислот астроцитами, опосредовано рецепторами, тогда как при ишемических повреждениях, их выброс, приводящий к нарушению гомеостаза и способствующий дальнейшему нейрональному повреждению, особенно при нейродегенеративных заболеваниях, обусловлен с набуханием астроцитов (Panickar K.S. and Norenberg M.D., 2005). Потеря астроцитов на фоне ишемии-гипоксии является важной составляющей в формировании очага инфаркта. Таким образом, влияние GPE на астроциты представляется одним из важнейших аспектов нейропротекторного действия короткого аналога. Ослабление эксайтотоксичности глутамата и увеличение содержания ГАМК после ишемии рассматривается, как еще один возможный механизм спасения нейронов от гибели, поскольку действие GPE связано также с предотвращением потери глутамат декарбоксилаза-иммунопозитивных нейронов. Участие в регуляции активности NO-синтазы, а, следовательно, положительное влияние на локальный мозговой кровоток, может также лежать в основе нейропротекторного действия трипептида (Guan J. et al., 1999).

***Глицин-2-метилпролин-глутамат (G-2mPE).*** Для придания стабильности GPE в плазме, в его структуру была введена метильная группа (в пролиновом кольце), которая позволила преодолеть нестабильность пептида к энзиматическому расщеплению (Harris H. et al., 2005). Указанные структурные изменения привели к созданию нового аналога G-2mPE, период полувыведения которого в плазме длительнее в сравнение с глицин-пролин-глутаматом (Bickerdike M.J. et al., 2009). Экспериментальными исследованиями показано, что G-2mPE также обладает нейропротекторными свойствами, выражающимися в способности предотвращать нейрональные повреждения (Zhao X. et al., 2005; Svedin P. et al., 2007). Показано также, что продолжительное введение в течение 7 дней после ишемии G-2mPE позволяет значительно снизить степень выраженности неврологического дефицита в сравнении с однократным введением через 2 часа после гипоксии-ишемии. Интересным

представляется и способность G-2mPE влиять на ангиогенез, приводящая к увеличению плотности капилляров в ипсилатеральном полушарии, что и, свою очередь может привести к улучшению мозгового кровотока (Svedin P. et al., 2007). Установлено также, что эндогенный пептид ИФР-1 играет важную роль в ремоделировании сосудов после повреждения (Lopez-Lopez et al., 2004), путем стимуляции роста сосудов.

*Дикетопиперазины и другие циклические аналоги GPE и тиреотропного-релизинг гормона (TRГ).* Дикетопиперазины – это группа модифицированных циклических дипептидов, которые можно получить из эндогенных полипептидов. Наиболее изученными являются циклический гистидил-пролин и его модифицированные аналоги. Циклический гистидил-пролин образуется в результате расщепления TRГ (Faden A.I. et al., 1999). И эндогенный TRГ, и его короткий циклический аналог циклический Hys-Pro проявляют нейропротективные свойства при травматических повреждениях головного и спинного мозга. Некоторые биоактивные аналоги циклического Hys-Pro также предотвращают нейрональные повреждения и, улучшают моторные и когнитивные функции. На основании имеющихся данных, был сделан вывод, что циклический пролил-глицин, еще один эндогенный дикетопиперазиновый аналог с ноотропной активностью (Samonina G. et al., 2002), может быть возможным метаболитом GPE. Циклизация молекулы может приводить к увеличению стабильности к энзиматическому расщеплению и повышению проницаемости в ЦНС за счет увеличения липофильности.

В экспериментах показано, что нейроактивные дипептиды, сходные по своей структуре с пирацетамом (2-оксо-1 пирролидон ацетамид) — ноотропным средством непептидной природы, такие например, как NS-3, CG3703, цикло-гистидил-пролин и пироглутамат, являющиеся производными TRГ, также обладают ноотропным действием (Naftalin R.J. et al., 2004). Один из таких пептидов, цикло-пролил-глицин, обнаруженный в ЦНС как эндогенное соединение, обладает положительным влиянием на память (Гудашева Т.А. и совт. 2001). Кроме того, в экспериментальных исследованиях на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией и в культуре клеток нейробластомы человека линии SY-SY5Y с повреждением дофаминэргических нейронов нейротоксином установлено



сходство пирацетама с цикло-пролилглицином по антигипоксическому и нейропротекторному действию (Колясникова К.Н. и соавт., 2012).

Изучение нейропротекторных свойств цикло-пролил-глицина и одного из его аналогов – NNZ 2591 показало, что при центральном введении у последнего указанные свойства более выражены. По всей вероятности, это связано с введением аллильного заместителя в С-8а положении дикетопиперазинового кольца, который увеличивает липофильность соединения, а, следовательно, и его способность проникать из спинномозговой жидкости в мозговую ткань после интратекального введения препарата (Guan J. et al., 2007). Показано также, что способность синтезированного аналога проникать через ГЭБ не связана с нарушением его проницаемости, наблюдаемое при многих патологических состояниях, в том числе и при ишемии (Guan J. and Gluckman P.D., 2009). Согласно литературным данным, однократное введение NNZ 2591 приводит к улучшению гистологической картины, хотя продолжительное введение препаратов также приводит к выраженной долгосрочной (9 недель) нейропротекции (Guan J. et al., 2007). Систематическое введение производного дикетопиперазина, как было показано, также позволяет предотвратить соматосенсорный двигательный дефицит при ишемии-гипоксии. Faden A. и соавт. Предположили, что еще один аналог дикетопиперазина, полученный от ТРГ способствует восстановлению моторной и когнитивной функций у крыс и мышей после травматического повреждения мозга (Faden et al., 2005). Было установлено, если однократное введение позволяет лишь предотвратить гибель нейрональных клеток в первые несколько часов после ишемии, то последовательное введение может влиять уже на более глубокие процессы, которые наблюдаются в течение последующих дней после повреждения, а как известно, наличие долгосрочного нейропротекторного действия очень важно для эффективности терапии, поскольку кратковременные эффекты не всегда приводят к долгосрочному восстановлению неврологических функций (Fisher M. and Schaebitz W., 2000; Gladsrone D.J. et al., 2002). Нейропротекторное действие NNZ 2591 может быть обусловлено ингибированием каспаза-зависимого апоптоза, поскольку в экспериментах доказана способность дикетопиперазинового производного подавлять экспрессию белков каспазы-3, являющегося маркером каспаза-зависимого пути отсроченной клеточной смерти.

Ингибирование реактивной глиии и повышение количества астроцитов, также, может играть определенную роль в проявлении указанной активности NNZ 2591 (Guan J. et al., 2007).

В механизмах действия другого производного дикетопиперазинового ряда – В35, задействовано предотвращение гибели нейрональных клеток, без влияния на мозговой кровотоков путем ингибирования процессов, как некроза, так и апоптоза вследствие травматического повреждения головного мозга. Более того, снижение глутаматной эксайтотоксичности, бета-амилоид индуцированной клеточной смерти, и, стимуляция факторов выживания клеток также могут лежать в основе нейропротекторного действия дикетопиперазинов *in vitro* (Faden A.I. et al., 2005).

**Карнозин ( $\beta$ -аланил-L-гистидин)** – еще один пептид, обнаруженный в глиальных клетках ЦНС (Rajanikant G.K. et al., 2007), который имеет доза-зависимую способность снижать объем некротической зоны, предотвращать уменьшение количества ключевого эндогенного антиоксиданта глутатиона, и подавлять активность матричных металлопротеиназ после перманентной окклюзии средней мозговой артерии у мышей (Min G. et al., 2008; Ок-Nam Bae, et al., 2013).

**Орексин-А** – новый эндогенный нейропептид, участвующий в регуляции различных физиологических процессов, включая метаболизм глюкозы. В экспериментальных исследованиях показана его способность уменьшать нейрональные повреждения, вследствие уменьшения постишемической толерантности к глюкозе (Harada Sh. et al., 2011, 2012).

**Церебролизин** (гидролизат белковой вытяжки головного мозга животных, содержащий 15% пептидов) стимулирует нейрогенез на моделях инсульта и болезни Альцгеймера (Rochenstein E. et al., 2011).

Все вышеуказанное подтверждает значительную роль нейропептидов и их коротких аналогов в восстановлении функции ЦНС после повреждающих воздействий, в частности, после ишемии-гипоксии, и открывает перспективы в создании новых эффективных средств, для применения в терапии ишемического инсульта.

#### 1.4. Ноопепт – новый оригинальный ноотропный препарат на основе дизайна коротких пептидов

Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролил глицина) или GVS-111 (рис. 1) – новый ноотропный препарат, разработанный в НИИ Фармакологии РАМН им. Закусова, на основе дизайна коротких пептидов (Гудашева Т.А. Сколдинов А.П., 2003).

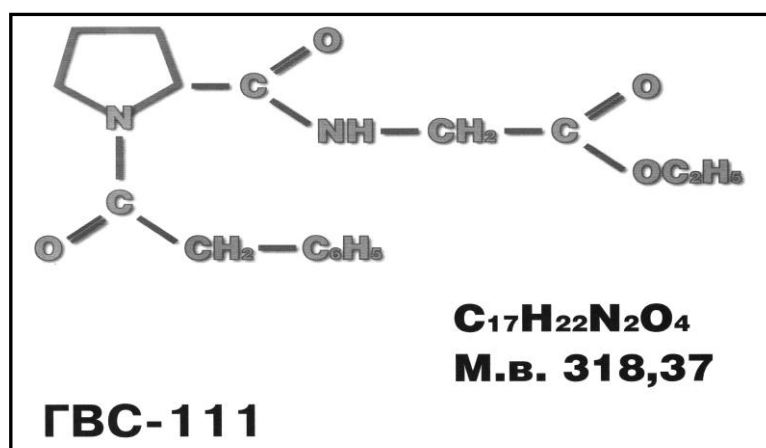


Рисунок 1. Структура ноопепта (этилового эфира N-фенилацетил-L-пролил глицина).

Ноопепт представляет собой дипептидный аналог пирацетама и обладает выраженным антиамнестическим, мнемотропным и анксиолитическим действием. Отдельного упоминания заслуживает биотрансформация ноопепта. Экспериментальными исследованиями показано, что он метаболизируется в организме с образованием активного метаболита – цикло-пролил-глицина (Бойко С.С. и соавт., 2000; 2004).

Стимулирующее влияние препарата на процессы памяти и обучения было продемонстрировано во многих экспериментальных исследованиях. Так, например, было выявлено, что дипептид ослабляет выраженность амнестического действия электрошока в тесте УРПИ, при этом, начальная активная доза соединения при внутрибрюшинном введении составляла 0,1 мг/кг, а антиамнестический эффект был максимально выражен в дозах 0,5 – 0,8 мг/кг. Причем, при увеличении дозы до 1,2 мг/кг имело место исчезновение эффекта, а при увеличении дозы до 10 и 20 мг/кг указанный эффект снова проявлялся.

Помимо того, что ноопепт, по сути, демонстрирует куполообразную зависимость доза-эффект, характерную для пептидэргических средств, специфику его действия составляет пока не ясный по своим механизмам двугорбый характер такой зависимости (Островская Р.У. и соавт., 2002)

Эффекты ноопепта были также выявлены на моделях антероградной амнезии, вызванной введением, перед обучением, блокаторов различных медиаторных систем, таких как скополамин, мекаламин, МК-801, кетамин и цетиловый эфир пролина (новый амнестический агент, разработанный в НИИ Фармакологии РАМН). Во всех экспериментах ноопепт устранял амнезию, вызванную введением указанных веществ (Островская Р.У. и соавт., 2001; 2002; Бельник А.П. и соавт., 2007). Антиамнестическое действие ноопепта было показано и на модели дозированного компрессионного повреждения лобной коры (Романова Г.А. и соавт., 2000).

Для оценки влияния ноопепта на когнитивные функции было исследовано его действие на обучение животных в тестах УРПИ и УРАИ, причем, эффекты дипептида, в последнем случае, были сравнены с таковыми у эталонного ноотропа – пирацетама. На всех указанных моделях мнестического дефицита оптимальная доза ГВС-111 составляла 0,5 мг/кг. Следует отметить, что для пирацетама уровень эффективных доз составляет (в зависимости от теста) 200 - 500 мг/кг. Таким образом, по уровню эффективных доз ГВС-111 превосходит пирацетам в 400 - 1000 раз. Полученные результаты показали, что введение препарата позволяет увеличить число обучаемых животных, а эффекты ноопепта выгодно отличаются от действия непептидного аналога. Дипептид облегчает все фазы процессинга памятного следа, тогда как пирацетам, в отличие от ноопепта, влияет преимущественно на начальные фазы обработки информации (Рябчикова Н.А. и соавт., 2001), а фазу её извлечения не улучшает, или даже ухудшает (Воронина Т.А. и Середенин С.Б., 1998). Полученные экспериментальные данные были дополнены исследованиями Ковалева Г.И. и соавт., показавшими, что ноопепт и пирацетам существенно отличаются по ЭЭГ-эффектам при продолжительном (9 дней) введении (Ковалев Г.И. и Воробьев В.В., 2002). Электрофизиологический анализ показал, что ноопепт облегчает синаптическую передачу на уровне коры головного мозга и гиппокампа. В частности, он показал способность

увеличивать амплитуду транскаллозального ответа, что свидетельствует об облегчении межполушарной ассоциативной передачи на уровне коры головного мозга (Молодавкин Г.М. и соавт., 2002). Выявлена также способность ноопепта облегчать длительную гиппокампальную потенциацию, рассматриваемую в качестве электрофизиологического эквивалента памяти. Количественный анализ ЭЭГ выявил способность дипептида увеличивать частоту гиппокампального тета-ритма. Указанная совокупность электрофизиологических эффектов высокоспецифичная для действия ноотропов (Воронина Т.А и Середенин С.Б., 1998).

Генотипзависимая ноотропная активность дипептида показана в исследованиях Бельника и соавт., где ноопепт, в дозе 0,5 мг/кг, заметно повышает способность мышей C57BL/6J BALB/c линий решать элементарные логические задачи в модифицированном водном лабиринте Морриса (Belnik A.P. et al., 2009).

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о выраженном влиянии препарата на высшие интегративные функции ЦНС и более широким, по сравнению с классическим ноотропом, спектре ноотропных эффектов, причем, следует отметить, что указанные отличия носят не только количественный, но и качественный характер.

Более того, дальнейшие клинические исследования показали, что применение ноопепта у пациентов с умеренными когнитивными расстройствами сосудистой или травматической природы приводит к устойчивому ноотропному и анксиолитическому эффекту, а, в сравнении с пирацетамом – к менее выраженному психостимулирующему действию. Помимо прочего, ноопепт выгодно отличается от пирацетама относительная безопасность (Neznamov G.G. and Teleshova E.S., 2009).

Помимо положительного мнемотропного действия, ноопепт, также проявляет анксиолитический эффект, выявленный на нескольких экспериментальных моделях: “приподнятый крестообразный лабиринт”, “открытое поле” и “тест конфликтного поведения”. В указанных экспериментах препарат положительно влиял на параметры поведения, которые характеризуют тревожность: время в открытых рукавах, количество наказуемых взятий воды, агрессивное поведение. Основываясь на концепции генетической

детерминированности стрессовой реакции, было изучено влияние ноопепта (в интервале доз 0,5-2,5 мг/кг) на двигательную активность мышей линии Balb/C и C57Bl/6. Показано, что препарат, также как и его основной метаболит, цикло-пролил-глицин, подобно другим селективным анксиолитикам активизирует поведение мышей линии Balb/C, для исходного поведения которых характерна фризинговая реакция на стресс (Середенин С.Б. и соавт., 2002). Наличие анксиолитического действия в спектре фармакологической активности ноопепта подтверждается также, как его способностью вызывать температурозависимое усиление связывания меченого тритием диазепама нейросинапсами коры головного мозга (Островская Р.У. и соавт., 2002).

Несмотря на то, что ноопепт относится к истинным ноотропам с доминирующим мнестическим эффектом, в настоящее время проводится изучение его нейропротекторных свойств, а также, выявление их механизмов. Предпосылкой к этому служат результаты экспериментов, свидетельствующие о многокомпонентном спектре фармакологической активности, характерной, как уже отмечалось ранее, для препаратов пептидной природы.

**Антитромботическое действие ноопепта.** Изучение влияния ноопепта на основные показатели тромбообразования, показало, что ноопепт оказывает антитромботический эффект, влияя на различные этапы свертывания, а именно, проявляет фибринолитическое и антикоагулянтное действие. Так, дипептид замедляет превращение протромбина в тромбин. Он также ингибирует преобразование фибриногена в фибрин и активизирует превращение плазминогена в плазмин, усиливает дестабилизацию фибрина за счет снижения активности XIII а фактора, что свидетельствует о его фибринолитической активности. При этом, ноопепт не оказывает прямого антиагрегантного эффекта.. Интересным представляется тот факт, что метаболит ноопепта — цикло-пролил-глицин также проявляет вышеназванные эффекты *in vitro*, однако, в отличие от своего предшественника, оказывает также выраженное антиагрегантное действие (Островская Р.У. и соавт., 2002).

**Противовоспалительное действие ноопепта.** На сегодняшний день уже известно, что различные повреждающие воздействия, особенно ишемия, ведут к образованию провоспалительных цитокинов (интерлейкины, фактор некроза опухоли и др.) (Scichita T. et

al., 2014). Противовоспалительная активность ноопепта была исследована в различных экспериментах. Так, например, в классических моделях острого неиммунного (воспалительная реакция на Кон А и каррагенан) и хронического иммунного воспаления (адьювантный артрит Фрейнда) показано наличие у дипептида выраженного противовоспалительного действия, не уступающего по своей эффективности стандартным нестероидным противовоспалительным средствам – ибупрофену и напроксену. Кроме того, Алексеевой и соавторами при изучении влияния ноопепта на уровень цитокинов показано, что курсовое введение препарата позволяет снизить повышенный на фоне воспаления уровень ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  (Коваленко и соавт., 2002; Алексеева С.В. и соавт., 2012).

**Антиоксидантное действие.** Особое внимание было уделено исследованию влияния ноопепта на один из компонентов метаболической триады – окислительный стресс. Антиоксидантная активность ноопепта была изучена *in vitro* на моделях нейродегенерации, вызванной оксидативным стрессом. Это две культуры из тканей, полученных при прерывании беременности по медицинским показаниям: культура нормальных нейронов коры головного мозга, подвергшихся действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ M в течение 1 часа и, культура нейронов коры головного мозга, плодов с синдромом Дауна. В этих экспериментах установлено, что экспозиция нормальных кортикальных нейронов перекисью водорода в токсичных концентрациях приводит к морфологическим и структурным изменениям, связанным с нейрональным апоптозом и дегенерацией более чем 60% культуры ткани. В качестве препаратов сравнения были исследованы пирацетам (эталонный ноотроп), витамин E, s-PBN (N-трет-бутил-2-сульфо-фенилнитрон) и пропиол галлат (антиоксиданты). При введении дипептида в культуру нейронов в широком диапазоне доз было установлено, что ноопепт значительно повышает нейрональную выживаемость после воздействия перекиси водорода, и данный эффект носит дозозависимый характер в интервале концентраций 10nM-100  $\mu$ M, при значении IC<sub>50</sub> 1.21 $\pm$ 0.07  $\mu$ M. Установлено, что ноопепт уменьшает степень накопления внутриклеточных продуктов перекисного окисления липидов и свободных радикалов, образующихся в условиях оксидативного стресса. Кроме того, было показано, что антиоксидантное действие ноопепта значительно превышает таковое у пирацетама, а, также, и у антиоксидантов по уровню эффективных доз (витамин E повышал выживаемость

нейронов лишь в концентрации  $10^{-4}$ М, а ноопепт— $10^{-6}$ М). В пределах данного исследования было показано также, что вследствие повышенной выработки свободных радикалов, нейроны от плода с синдромом Дауна характеризуются ускоренной гибелью. Ежедневное введение препарата в культуру нейронов в течение 7 дней (концентрация -  $10^{-6}$ М) приводило к значительному понижению выраженности дегенеративных изменений и повышению нейрональной выживаемости (Pelsman A. et al., 2003).

Лысенко и соавторами показано также, что ноопепт (в дозе 0,12 мг/кг в/б) предотвращает накопление шиффовых оснований и дизеновых конъюгатов в мозговой ткани и плазме крови в условиях оксидативного стресса, обусловленного иммобилизацией (Лысенко А.В. и соавт., 1997).

Оценка антиоксидантной активности ноопепта проводилась также на модели  $Fe^{2+}$  индуцированной хемилюминесценции липопroteинов (ХЛ) сыворотки крови человека. Ноопепт, также как и препараты сравнения (пирацетам, витамин Е и ловушка свободных радикалов PBN) повышал длительность латентного периода ХЛ, что свидетельствует об эндогенном антиоксидантном потенциале. Причем, дипептид оказался более эффективным: он увеличивал этот показатель при концентрациях в пробе  $10^{-6}$ М, а препараты сравнения - в концентрациях  $10^{-4}$ -  $10^{-5}$ М. Ряд возрастающей антиоксидантной активности оказался следующим: Ноопепт > витамин Е > PBN > Пирацетам (Pelsman A. et al., 2003).

***Нейропротекторное действие ноопепта in vitro u in vivo.*** В экспериментах на изолированных нейронах виноградной улитки был продемонстрирован блокирующий эффект ноопепта в отношении потенциал-зависимых кальциевых и кальций-зависимых калиевых каналов. Причем кальциевые каналы ноопепт блокирует, начиная с концентраций  $10^{-7}$ М, а калиевые каналы – уже в концентрациях  $10^{-8}$ М. Следует отметить, что пирацетам в этих концентрациях не влияет на состояние как кальциевых, так и калиевых каналов (Solntseva et.al., 1997).

В исследованиях, выполненных на диссоциированной культуре зернистых нейронов мозжечка крыс линии Wistar показано, что ноопепт ( $10^{-6}$ М) уменьшает гибель клеток, вызванную воздействием нейротоксических доз глутамата. Исходя из того, что одной из возможных причин уменьшения нейротоксического действия глутамата может быть



изменение его содержания, было изучено его влияние на высвобождение последней. Препарат в концентрации  $10^{-7}$ М вызывал снижение стимулированного высвобождения на 210%; эффект составил 120% при  $10^{-6}$ М и 150% при  $10^{-5}$  М. Таким образом, наиболее выраженное действие препарата проявилось в концентрации  $10^{-6}$ М, т.е. кривая доза-зависимость снова носила «куполообразный» характер (Островская Р.У и соавт., 2002).

При изучении влияния дипептида на фоне повреждений, вызванных дистальной окклюзией средней мозговой артерии в совокупности с перевязкой ипсилатеральной общей сонной артерии через 3 суток после оперативного вмешательства было показано, что ноопепт, вводимый через 15 мин, 2 ч, 24 и 48 ч снижает объем ишемического поражения коры большого мозга (Гаврилова С.А. и соавт., 2006).

### Другие эффекты ноопепта

**Эффекты ноопепта при моделировании болезни Альцгеймера.** На модели ольфакторной бульбэктомии мышей линии NMRI, показано, что ноопепт, при продолжительном введении в течение 21 дня, в дозе 0,01 мг/кг, устраняет дефицит пространственной памяти, вызванный оперативным вмешательством. Он также избирательно повышает титр антител к префибриллам  $\beta$ -амилоида<sub>(25-35)</sub> (Бобкова Н.В. и соавт., 2005). Эффективность дипептида при данной патологии доказана и на стрептозициновой модели (введение последнего в желудочки мозга вызывает метаболические нарушения, характерные для данной патологии) (Островская Р.У. и соавт., 2010). Последние исследования также показали, что ноопепт обладает протективным действием при  $\alpha/\beta$ <sub>(25-35)</sub> индуцированной токсичности в PC12 клетках, увеличивая выживаемость клеток и уменьшая апоптоз (Ostrovskaya R.U. et al., 2014).

Ряд работ был посвящен исследованию влияния дипептида в различных экспериментальных **моделях диабета**. Так, например, на модели индуцированной стрептозоцином диабета показано, что ноопепт при пероральном применении обладает гипогликемическим действием, способствует нормализации таких параметров как уровень инкретина GLP-1 и инсулина в крови, приводя к нормализации уровня глюкозы и

уменьшению толерантности к ней при хроническом введении. Показано также, что действие дипептида не опосредовано его влиянием на дипептидил пептидазу IV (Ostrovskaya R.U., Zolotov N.N. et.al, 2014; Ostrovskaya R.U., Ozerova I.V. et.al, 2014).

Исследовано также влияние ноопепта на фоне активации систем стресса и антистресса в раннем онтогенезе, стимулированном введением КРГ или БТШ-70. Выявлено, что эффекты пептидов зависят от пола животного, а для ноопепта характерно психоактивирующее и антиагрессивное действия (Шабанов П.Д. и соавт., 2006).

Кравченко и соавт. Установили, что ноопепт обладает способностью увеличивать противосудорожную активность вальпроата у мышей, что открывает новые перспективы для его использования при широком спектре неврологических заболеваний (Кравченко Е.В. и соавт., 2009).

Совокупность полученных экспериментальных данных подтверждает наличие у дипептида разнонаправленного и широкого спектра фармакологической активности и дает основания для более углубленного изучения его нейропротекторных свойств.

## Г Л А В А 2.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных задач были использованы методы, позволяющие оценить величину мозгового кровотока, состояние микроциркуляторного русла и морфологический статус мозга крыс, а так же память и поведение животных.

Все экспериментальные животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария, при свободном доступе к пище и воде. Маркировка животных, инъекции и другие необходимые манипуляции проводились при соблюдении принятых международных стандартов по обращению с животными (“The PHS Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”).

#### **2.2. Моделирование локальной ишемии мозга, вызванной перевязкой средней мозговой артерии.**

Моделирование локальной ишемии мозга крыс, вызванной перевязкой средней мозговой артерии, проводилась по А. Tamura et al. (1981), в модификации А.В. Топчяна и соавторов (1997г). Исследования проводились на белых беспородных крысах массой 200-250г под общей анестезией хлоралгидратом (400мг/кг, в/б). Для этого животных помещали в специально сконструированную установку, которая позволяет удобно и жестко фиксировать голову в боковом положении левой стороной вверх. Операцию производили с помощью нейрохирургической бинокулярной лупы с волокнистым осветителем (ЛБВО) фирмы ЛОМО (Санкт-Петербург). После удаления шерстяного покрова и обработки операционного поля производили разрез кожи по ходу скуловой кости (около 2 см). Затем расширяли раневую поверхность ранорасширителем и обнажали слюнную железу, расположенную в задне-нижнем квадрате операционного поля (рис. 2) С помощью микрохирургических инструментов слюнную железу вместе с сосудистым сплетением аккуратно отделяли от

окружающих тканей и перемещали в задне- верхний квадрат с ее последующей иммобилизацией (рис. 2 Б).

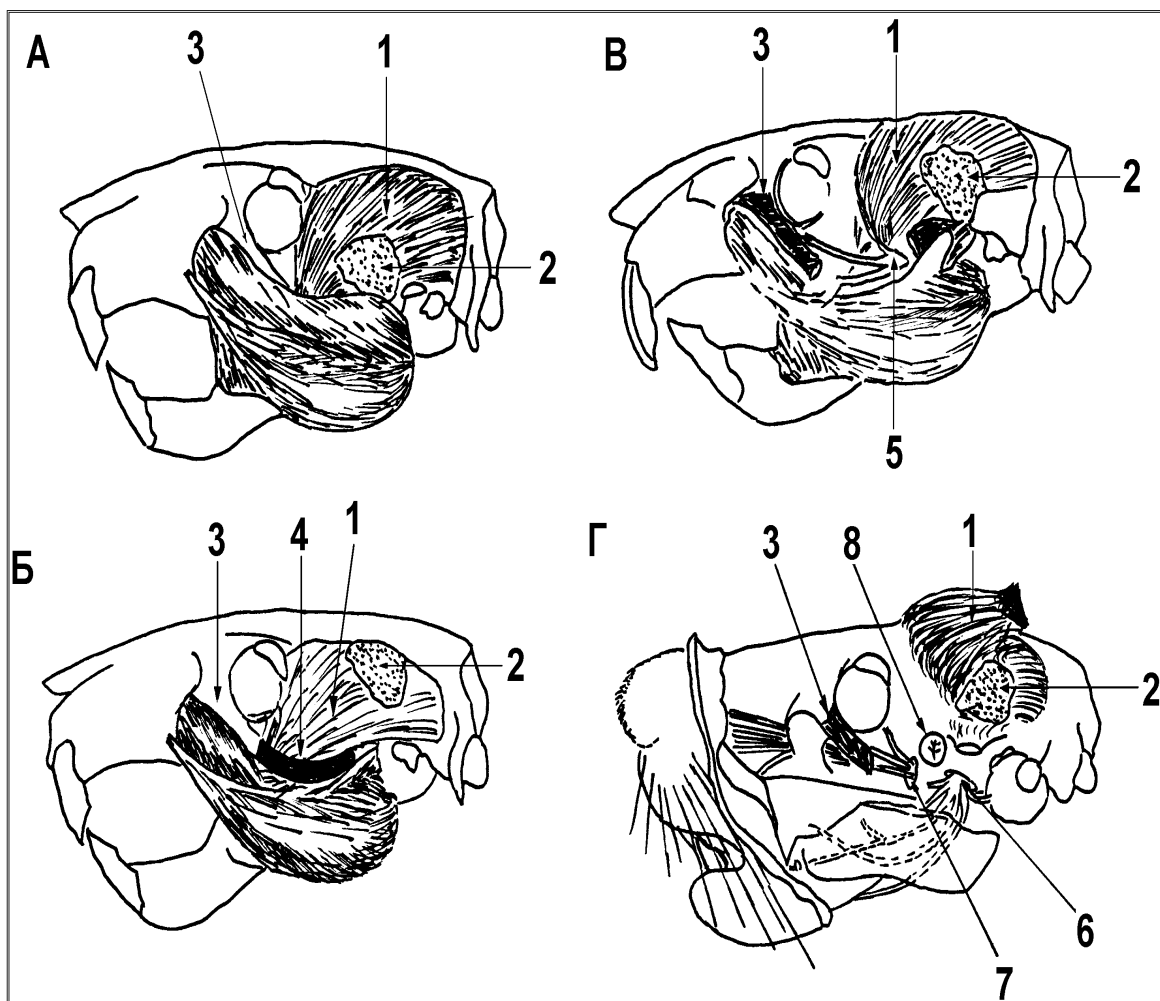


Рисунок. 2. Этапы оперативного подхода при перевязке средней мозговой артерии у крыс (А,Б,В,Г) (Топчян А.В. и соавт.,1997).

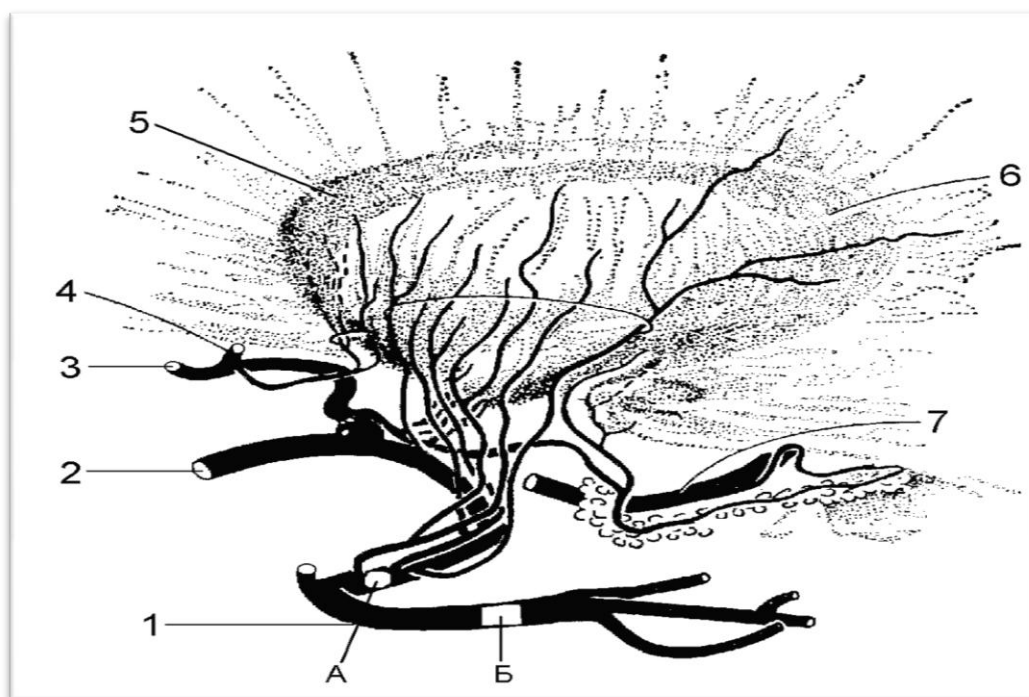
- 1 - височная мышца,
- 2 - слюнная железа,
- 3 - скуловая кость,
- 4 - зона резекции скуловой кости,
- 5 - нижнечелюстной нерв,
- 6 - овальное отверстие,
- 7 - отверстие зрительного нерва,
- 8 - зона трепанации черепа в области расположения СМА

После удаления скуловой кости раскрывались края крепления височной мышцы к нижней челюсти и с помощью бормашины производился разрез кости по краю крепления к ней сухожилия указанной мышцы (рис. 2 Г).

Далее, поднимали с помощью крючков нижний край височной мышцы кверху (рис. 1В) и перед нами обнажалась височная ямка, дно которой образует крыловидная мышца с проходящим рядом нижнечелюстным нервом. С помощью специально сконструированного ранорасширителя раздвигали крыловидную мышцу, вследствие чего открывалась поверхность черепа между овальным отверстием и отверстием зрительного нерва (рис. 2 Г). В этой области, а именно, под нижним краем височно-челюстного сустава, сверлили отверстие диаметром около двух миллиметров и тем самым обнажали место расположения средней мозговой артерии (рис. 2 Г).

Дальнейшую операцию по перевязке указанной артерии проводили под микроскопом (ОГМЭ-ПЗ) с большим фокусным расстоянием ( $f=190\text{мм}$ ) под большим увеличением (14,0x3,3). Под левую среднюю мозговую артерию подводили иглу с этиконовой нитью толщиной 10/0 (Ethicon Ltd.), прокалывая иглой твердую мозговую оболочку. Здесь следует отметить, что в отличие от метода А. Tamura et al. (1981), твердая мозговая оболочка не удалялась, а перевязывалась вместе со средней мозговой артерией. Для увеличения зоны ишемического поражения, согласно модификации предложенной А. Топчяном и соавторами, перевязку средней мозговой артерии проводили возле ее основания (рис. 2 Г), тогда как А. Tamura и соавторы (1981) перевязывали среднюю мозговую артерию дистальнее первой ветви, отходящей от средней мозговой артерии (рис. 3). После перевязки ток крови по средней мозговой артерии прекращался, что можно было наблюдать в поле зрения под микроскопом.

С целью проведения последующих опытов на бодрствующих животных, топография мышц и мягких тканей операционного поля по возможности восстанавливалась. В частности, укреплялись сухожилия височной мышцы к нижней челюсти для сохранения жевательного процесса. При такой постановке опыта создавалась возможность для проведения исследований у оперированных животных в необходимый для экспериментов промежуток времени.



*Рисунок. 3. Глубинные ветви средней мозговой артерии.*

*Обозначения: 1 – средняя мозговая артерия; 2 – внутренняя сонная артерия; 3 – передняя мозговая артерия; 4 – передняя соединительная артерия; хвостовое ядро; 6 – скорлупа; 7 – задняя мозговая артерия. А – место перевязки по осуществленной модификации; Б – место перевязки, предложенное Tamura et al., (1981).*

## **2.2. Моделирование нарушений мозгового кровообращения**

Для моделирования нарушений церебральной гемодинамики осуществляли перевязку правой общей сонной артерии у наркотизированных животных. Исследования проводились на белых беспородных крысах массой 170-230 г под общей анестезией нембуталом (45 мг/кг, внутривенно).

Для этого после фиксации животных на спине в специальном устройстве, удаляли шерстяной покров и обрабатывали операционное поле и на передней поверхности шеи проводили срединный разрез. После этого выделяли правую общую сонную артерию (рис. 4 А), на которую затем накладывали лигатуру из шелковой нити.

### **2.3. Исследование локального мозгового кровотока крыс методом лазерной доплеровской флоуметрии.**

Опыты проводились на белых беспородных крысах-самцах массой 170-230г под общей анестезией, вызванной внутрибрюшинным введением нембутала в дозе 45 мг/кг, при естественном дыхании. За день до эксперимента крысы лишались пищи, при свободном доступе к воде.

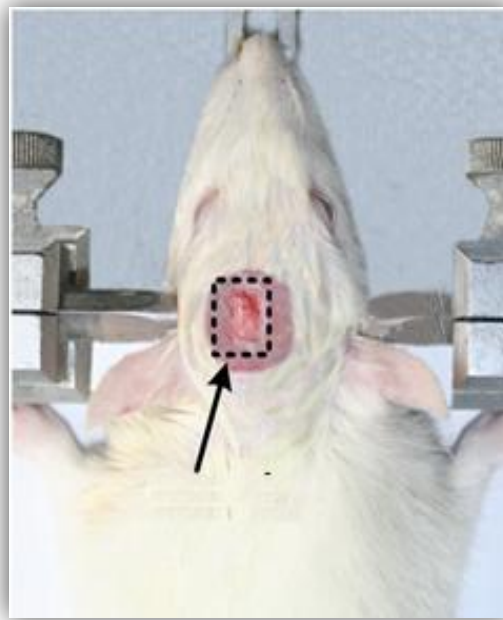
Локальный мозговой кровоток регистрировали методом лазерной флоуметрии, широко применяемой в настоящее время для исследования объемного МК в физиологических экспериментах (как в норме, так и патологии), а так же для оценки цереброваскулярной активности соединений (Александрин В.В, 2000; Луньшина Е.В., 2001; Александрин В.В. и соавт, 2002; Durduran T. et al., 2004; Ayata C., 2004). Регистрацию ЛМК проводили в теменной области коры головного мозга животных с помощью двухканального лазерного доплеровского флоуметра фирмы “Transonic System Inc.” (США) BLF-21 с игольчатым датчиком (типа N), который позволяет оценить состояние кровотока на капиллярном уровне.

Суть метода состоит в том, что монохроматический пучок света малой интенсивности, излучаемый лазерным диодом, встроенным в флоуметр, проходит по гибкому световоду и через наконечник датчика освещает исследуемую ткань. В ткани свет рассеивается отражающими частичками. Часть света отражается обратно и по приемному световоду попадает на внутренний фотоприемник аппарата. В соответствии с эффектом Доплера, только движущиеся частицы, в основном эритроциты приводят к частотному сдвигу, который регистрируется и после обработки сигнала рассчитывается объем потока выраженный в мл/мин/100г ткани. Глубина проникновения лазерного пучка в ткани мозга составляет 0,6 - 1,5мм и этого достаточно, чтобы получить информацию, как от поверхности, так и от глубины сосудистого сплетения коры головного мозга (К.Г. Саркисов, Г.В. Дужак, 1999). Преимуществом данного метода перед другими, среди прочих, является возможность длительной и непрерывной регистрации ЛМК в течении нескольких часов. Несмотря на то, что регистрируемая величина ЛМК зависит от месторасположения датчика (в частности от

близости к крупным сосудам), т.е. является величиной относительной, тем не менее, валидация метода Tonnensen и соавт. показала, что он подходит для непрерывной регистрации изменений ЛМК (Tonnensen et al., 2005).



А



Б

*Рисунок 4. Этапы оперативных манипуляций предшествующих измерению ЛМК методом лазерной доплерографии*

*А – наложение лигатуры на общую сонную артерию*

*Б – трепанационное “окно”*

Локальный мозговой кровоток рассматривали как в норме, так и на фоне нарушения кровоснабжения мозга, вызванного односторонней окклюзией общей сонной артерии. После предварительного наложения лигатуры (без окклюзии) на сонную артерию (см. 2.2), крыс фиксировали в стереотаксической установке (на 2 см выше туловища), при помощи ушных кернов, держателя резцов и клеммы для носа так, чтобы голова животного была жестко закреплена (Топчян А.В., 1997). После вскрытия мягких тканей головы производили трепанацию черепной коробки (рис. 4 Б) в теменной области ипсилатерального полушария (“окно” диаметром от 5х3 мм), до поверхности твердой мозговой оболочки, которая



оставалась интактной, после чего игольчатый датчик лазерного доплеровского флоуметра диаметром 0.8 мм, закрепленный на специально сконструированном коромысле с помощью микроподачи, фиксировали в зоне измерения, в вертикальном положении. При фиксации старались избегать непосредственного наложения датчика на крупные сосуды (Ulrich et al., 1998).

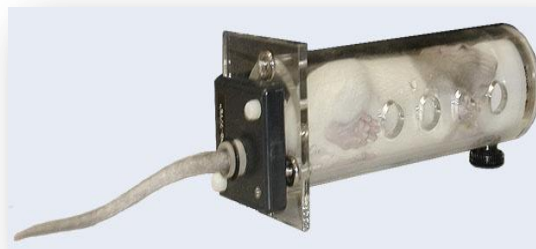
После завершения подготовительной части эксперимента регистрировали исходный мозговой кровоток ипсилатерального полушария в течении 30 минут (внутренний контроль), затем перевязывали сонную артерию и наблюдали за изменениями ЛМК в течении 30 минут. Регистрацию изменений микроциркуляции под действием препарата проводили в течении 90 минут после внутрибрюшинного введения ноопепта. Особенностью данного метода является то, что при оценке изменений МК после ишемии или на фоне введения препарата, в каждом опыте используется внутренний контроль, который позволяет не только получить точные результаты, но и устранить негативные влияния возможных отклонений в ходе каждого эксперимента.

#### **2.4. Определение системного артериального давления крыс не инвазивным методом «tail-cuff».**

Не инвазивный, прошедший валидацию (Feng M. et.al, 2008) метод “tail-cuff” широко используется для измерения системного артериального давления у грызунов (крысы, мыши) (Kurtz T.W. et.al, 2005; Feng M. and DiPietro K, 2009). Одним из преимуществ таких методов определения, является возможность повторного, периодического измерения АД у бодрствующих животных (что исключает влияние анестезии) в экспериментах с различной продолжительностью (Kurtz T.W. et.al, 2005).

Систолическое и диастолическое артериальное давление измеряли у бодрствующих белых беспородных крыс массой 170-220 г, в хвостовой артерии, при помощи аппарата LE5001 (рис. 5), регистрирующего так же среднее давление и частоту сердечных сокращений. Измерения проводили между 13.00 и 15.00 ч во избежание влияния циркадного цикла. Животных, отобранных для эксперимента, предварительно в течение 3

последовательных дней, обучали нахождению в пластмассовом футляре (по 15 минут). Животное, взятым за хвост, осторожно помещали в футляр и фиксировали (при помощи подвижной части) так, чтобы ограничить свободу движений, избегая при этом травмирования или защемления частей тела (Daugherty A. et al., 2009). Манжета с датчиком закреплялась на хвосте (так близко к основанию, насколько это возможно) животного, помещенного в камеру, установленную на платформе. Учитывая результаты исследований Kubota Y. и соавторов (2006), свидетельствующих о том, что использование подогрева в тесте “tail-cuff” может спровоцировать стресс-индуцированное изменение АД, наш выбор был остановлен на модификации метода, без подогрева животного до  $35\text{ C}^0$ , при условии, что температура окружающей среды будет не ниже  $23\text{ C}^0$  (Kubota Y. et.al, 2006). Во избежание влияния внешних факторов на результаты эксперимента, все условия окружающей среды (температура, звукоизоляция освещение и т.д.), а так же манипуляции с животными (инъекции, помещение и извлечение из камеры и т.д.) поддерживались стандартными (Kurtz T.W. et.al, 2005).



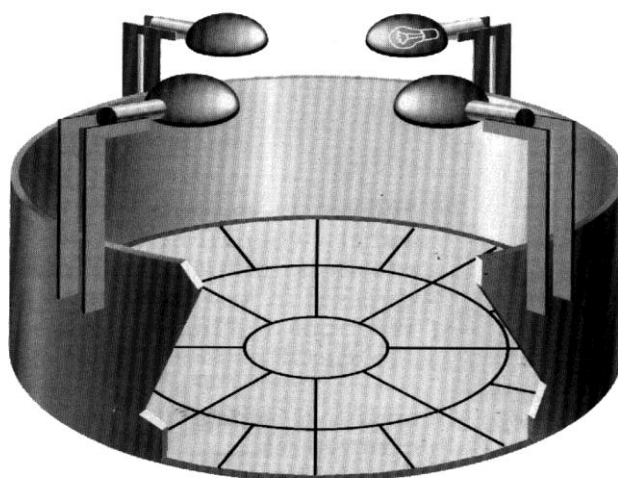
*Рисунок 5. Аппарат для измерения артериального давления неинвазивным методом “Tail-Cuff”.*

Для проведения эксперимента предварительно обученных животных помещали в футляр и, каждые 5 минут, проводили последовательное измерение исходного системного АД. Величина АД, в течение 20 минут (за величину исходного артериального давления и ЧСС принимали среднее значение всех измерений). Затем животных извлекали из камеры и,

через определенный промежуток времени, внутрибрюшинно, вводили ноопепт. После чего крыс снова помещали в камеру и проводили мониторинг изменений системного АД и ЧСС, путем последовательных измерений каждые 10 минут в течение 80 минут. Величина АД выражалась в миллиметрах ртутного столба.

## 2.5. Исследование поведения животных в тесте «Открытое поле».

Тест применялся для определения эмоциональности и локомоторной активности крыс (Бессалова Е.Ю., 2007). Установка «Открытое поле» представляет собой белую круглую арену диаметром 200 см, окруженную со всех сторон бортами высотой 50 см. Поверхность арены равномерно освещается 4-мя лампами по 100 Вт, расположенными на расстоянии 100 см от поверхности, которая разделена тремя concentрическими окружностями и диагональными линиями на 16 внешних - прилегающих к стенкам поля, и 9 центральных, не соприкасающихся со стенками, секторов (рис. 6).



*Рисунок 6. Схема установки «Открытое поле»*

Установка располагалась в затемненной, звукоизолированной комнате с постоянной температурой. Повторные тестирования проводились в одно и то же время суток, во избежание влияния циркадных ритмов. Протокол исследования включал подготовительный период и собственно тестирование. За час до тестирования исключались, какие либо

активные манипуляции с животными: кормление, перегруппировка, взятие на руки. Инъекции препарата и другие необходимые манипуляции, проводимые в подготовительный период, были выполнены максимально стандартным способом, так, чтобы погрешность опыта имела систематический характер. Непосредственно перед тестированием крыс выдерживали в темноте в течение 1 минуты и затем помещали в один из периферических квадратов «открытого поля». Наблюдения проводили в течение 5 минут, в течение которых регистрировали (за единицу перемещения принимали один пересеченный сектор, как только животное вступало на новый квадрат обеими передними лапами:

- периферическую активность – число пересеченных внешних квадратов (критерием для идентификации данной формы поведения являлось участие в перемещении животного всех четырех лап);
- центральную активность – число пересеченных квадратов в центральной области открытого поля;
- вертикальную активность (представленную двумя видами стоек - “Rearing” передние лапы на весу и “Climbing”-передние лапы упираются в стену) – число стоек;
- общую двигательную активность – суммарное число пересеченных квадратов на периферии, в центральной области и число стоек;
- количество актов дефекаций и груминга на протяжении всего теста – как эмоциональность;

Арену протирали влажной губкой после тестирования каждого животного.

## **2.6. Определение координации животных на вращающемся стержне**

Определение двигательной координации крыс проводилось на аппарате Rota-Rod Treadmills (рис. 7) for rats 7700 фирмы “UGO Basil” (Италия). Аппарат снабженный четырьмя барабанами диаметром 7 см, разделенными между собой плоскими дисками, позволяет проводить тест одновременно с несколькими животными и автоматически

фиксирует латентное время удерживания (в секундах) каждого животного на стержне вращающемся с постоянной заданной скоростью (8, 10, 12, 14, 16 грм).



*Рисунок 7. Установка “Вращающийся стержень” для определения координации крыс.*

Перед экспериментом животных обучали нахождению на вращающемся стержне, для чего крыс тренировали 2-3 раза, 1-2 минуты с интервалами 2-3 часа, с постепенным увеличением скорости вращения до максимальной. Животное считалось обученным, если при повторении теста время удерживания оставалось неизменным.

При тестировании животных держат за хвост, помещают на вращающийся барабан так, чтобы они двигались в направлении противоположном вращению стержня. Скорость вращения составляла 16 грм, при необходимости проводили 2-3 повторных измерения.

## **2.7. Исследование обучения и памяти животных в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ)**

Данная методика является базисной моделью для оценки влияния веществ на формирование и воспроизведение памятного следа в норме и патологии. Основными преимуществами данной методики является быстрота выработки рефлекса и возможность дифференцированно воздействовать на различные фазы памяти (Буреш Я., Бурешова О., 1991).

Установка УРПИ представляет собой находящуюся на высоте 50 см темную камеру,

снабженную электродным полом, соединенную с открытой платформой. В ходе эксперимента животное помещали на освещенную платформу спиной к входу в закрытый отсек. Крысы, в силу свойственного грызунам норкового рефлекса переходят в темную камеру, после чего раздвижную дверцу камеры закрывали и, через электродный пол, подавали обучающее электроболевое раздражение: ток 0.3-0.6 мА, продолжительность 3 сек, периодичность 3 раза. После чего крысу помещали обратно в клетку. Животное должно обучиться не заходить в темную камеру, где оно получило болевое раздражение и пассивно избегать неприятную ситуацию, находясь в светлом отсеке. Проверка сохранения УРПИ (воспроизведение рефлекса) производилась через 24 часа после обучения, повторным помещением животного на открытую освещенную платформу и регистрацией латентного времени первого захода в темный отсек в течении 300 секунд. Животные считались обученными, если при повторном эксперименте не заходили в темную камеру, в течении указанного времени наблюдения. Животные с меньшими показателями латентного времени исключались из эксперимента.

## **2.8. Исследование поведения животных в тесте «Приподнятого крестообразного лабиринта».**

Методика приподнятого крестообразного лабиринта основана на навыке предпочтения грызунами темных нор, естественного страха нахождения на открытых площадках и падения с высоты. В тесте приподнятого крестообразного лабиринта на крысах изучали анксиолитическую активность исследуемого соединения.

Выполненный из дерева лабиринт для крыс имеет форму креста (рис. 8) с двумя открытыми рукавами (длина - 50 см, ширина – 10 см), перекрещивающимися двумя закрытыми рукавами (длина - 50 см, ширина – 10 см, высота стенок – 40 см).

Крестообразный лабиринт окрашен в черный цвет и приподнят на высоту 50 см от пола. Во избежание падения животных открытые рукава окружены бортиком высотой 1 см.

Перед тестированием животных выдерживали в темноте в течение 1 минуты и затем помещали на центральную площадку в направлении к одному из открытых рукавов.



*Рисунок 8. Установка «Приподнятый крестообразный лабиринт».*

В течение 5 минут фиксировали отдельно:

- количество заходов открытые рукава лабиринта,
- количество заходов в закрытые рукава лабиринта,
- время пребывания животного в открытых рукавах лабиринта,
- время пребывания животного в закрытых рукавах лабиринта,
- время пребывания животного на центральной площадке.

Регистрация показателей, характеризующих поведение животных в лабиринте, проводилась наблюдателем в той же комнате на расстоянии приблизительно 1 м от лабиринта. Все эксперименты проводились при комнатном освещении во временном интервале от 9<sup>00</sup> до 14<sup>00</sup>. Показателями оценки поведения в данной модели являлись отношение числа заходов в открытые рукава к сумме заходов в открытые и закрытые рукава и время в открытых рукавах.

## **2.9. Количественное определение липофусцина в мозговой ткани крыс флуоресцентным методом**

Определение липофусцина в биологическом материале основано на его способности флуоресцировать в области 420-470 нм, при возбуждающей длине волны 340-370 нм (Fletcher

B.L. et al., 1973; Reddy K. et al., 1973; Csallany A.S. and Ayaz K.L., 1987).

После декапитации животных и извлечения мозга, точную навеску (0,2 г с точностью до сотой миллиграмма) мозговой ткани обоих полушарий гомогенизировали (предварительно избавившись от лишней влаги) со скоростью 1/4n hp, 1300 rpm (оборотов в минуту) в смеси растворителей хлороформ:метанол (2:1/v/v) в соотношении 20:1, в течение 1 минуты, при комнатной температуре. Затем осуществляли экстракцию водорастворимых компонентов, для чего к гомогенизату добавляли равное количество дистиллированной воды, интенсивно перемешивали, смесь помещали в 12 мл пробирку и центрифугировали 1-2 минуты на аппарате Т30 (ГДР). После отделения хлороформного слоя, к нему добавляли метанол, из расчета 0,1 мл метанола на 1 мл полученного раствора, для удаления мути. Удаление ретинола, который являясь жирорастворимым соединением, обладает флюоресценцией в указанном интервале длин волн, проводили экспозицией полученного раствора под интенсивным УФ светом (фотоокисление) в течение 3 минут.

Интенсивность флюоресценции (ИФ) хлороформных экстрактов полученных из гомогенизированной мозговой ткани, измеряли на флуоресцентном спектрофотометре MF-2A, Hitachi, Ltd. Токуо, Japan, при возбуждающей длине волны 365 нм и излучаемой длине волны 470 нм. Непосредственно перед измерением проводилась калибровка флуориметра раствором 0,1µг/мл хинина сульфата (х.ч.) в 0,1n растворе серной кислоты (ИФ=60-90).

## **2.10. Исследование морфофункционального состояния микроциркуляторного русла головного мозга крыс.**

Оценка состояния капиллярной системы коры головного мозга проводилась безинъекционным кальций аденозинтрифосфатным методом А. М. Чилингаряна (1977), который основан на избирательном осаждении свободного неорганического фосфора (образующегося при гидролизе аденозин-5-трифосфорной кислоты солями кальция) в структурах сосудистого русла. Метод обеспечивает не только избирательное четкое и контрастное выявление сосудисто-капиллярной сети, но и дает возможность одновременной



дифференциации различных звеньев микроциркуляторного русла (артериолы, капилляры, венулы).

Объектом исследования служили белые беспородные половозрелые крысы массой 200-250г, мозг которых, после декапитации под нембуталовым наркозом, фиксировался в 5%-ом формалине. Приготовление срезов проводилось после предварительной промывки фиксированного материала в течение 30 мин в проточной воде. Срезы толщиной 90-120 мкм, полученные при помощи микротомы-криостата М25, собирали в физиологический раствор (для кратковременно фиксированного материала) или дистиллированную воду (для длительно фиксированного материала), после чего инкубировали 1-5 часов в смеси содержащей: 2 мл глицинового буфера Серенсена, 2 мл 0.1 М раствора хлористого кальция, 1 мл раствора АТФ, 0.1 М свежеприготовленный раствор динатриевой соли аденозин-5-трифосфорной кислоты (5мг/кг), и 12 мл дистиллированной воды. После промывки в двух сменах дистиллированной воды по 5 мин., срезы помещали в замещающую свинцовую смесь приготовленную следующим способом: в 100 мл дистиллированной воды, после добавления 2-х капель уксусной кислоты, растворяли 2 г химически чистого ацетата свинца, после чего добавляли 10 мл 1 М ацетатного буфера (рН-6.2) и 15 мл 8% раствора уксуснокислого аммония. Смесь пригодна долгое время и может использоваться многократно.

После нахождения в указанной смеси от 10 минут до 1 часа и двукратной промывки, срезы погружали в 20% раствор уксуснокислого аммония от нескольких минут до нескольких часов в зависимости от сроков инкубации. Срезы вновь промывались в двух сменах дистиллированной воды, затем погружали в 2-5% раствор сернистого натрия 5-10 минут, после чего проводили окончательную промывку 20 мин. и заключали в глицерин-желатину.

Измерение диаметра капилляров проводили при помощи микрометра-МОВ-1-15<sup>х</sup> и программы DeltaPix Insight, в 100 полях зрения. В качестве диаметра одного капилляра принимали среднее значение от 2-6 измерений. Величину диаметра капилляров выражали в микрометрах. Высчитывали количество резко суженных, полностью закрытых и функционирующих капилляров.

### *Приготовление глицинового буфера Серенсена (pH-11,0-12,0)*

Взвешивали 5,57 г глицина и 5,845 г хлорида натрия и растворяли в 100 мл свежекипяченной дистиллированной воды. К 4,7 мл полученного раствора прибавляли 5,3 мл 1М раствора гидроксида натрия. pH полученного раствора измеряли на pH-метре (pH meter 209 HANNA Instruments) при необходимости pH раствора доводили до необходимого значения раствором глицина или гидроксида натрия.

### *Приготовление раствора 1н. ацетатного буфера (pH-6.2)*

131,3 г х.ч. ацетата натрия растворяли в 100 мл свежекипяченной (для удаления CO<sub>2</sub> дистиллированную воду кипятили в течении 30 минут, затем давали остыть, закрыв ватно-марлевой пробкой) и охлажденной дистиллированной воды, добавляли 2,03 мл ледяной уксусной кислоты и доводили объем раствора до метки. pH полученного раствора измеряли на pH-метре (pH meter 209 HANNA Instruments), который предварительно калибровали стандартным раствором фосфатного буфера с pH-6,86.

## **2.11. Морфологическое исследование головного мозга крыс.**

Объектом исследования служили белые беспородные крысы массой 200-250г. Для осуществления морфологических исследований головной мозг декапитированных животных сразу же после извлечения из черепной коробки фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезвоживали в этаноле, заливали в парафин, после чего готовили серийные срезы во фронтальной плоскости толщиной 3-5 мкм. Для оценки морфологических изменений мозговой ткани, полученные серийные срезы взятых из передне-медиального подотдела паранигрального ядра среднего мозга, окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля (Демченко В.В., Артемьев В.Н., 2006). Данный метод позволяет гистологически выявить некоторые клеточные элементы головного мозга, в том числе тела нейронов, астроцитов, олигодендроцитов, микроглиоцитов, эндотелиоцитов, а также

хроматофильную субстанцию (тигроидное вещество) в цитоплазме нейрона и оценить их реактивное состояние.

Гисто-морфологические исследования в тканях производили цифровой камерой Canon (Japan, 8 мегапикселей) на базе микроскопа "Jeneval" (Карл Цейс, Германия) с использованием объективов GF Plan 25x (0,50 – 0,17A), GF Plan 40x (0,65 – 0,17A), окуляра GF - PW 10x, соединенных с микроскопом и компьютером системой адаптеров указанной фирмы.

## 2.12. Статистическая обработка данных

Данные приведены в виде средних значений для групп  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ) или средних значений для групп  $\pm$  доверительный интервал ( $M \pm \sigma_m$ ). Для выборок проводилась предварительная проверка гипотезы о распределении (Q-Q plot, одновыборочный тест Колмогорова-Смирнова) данных или их отличий (для попарно связанных вариантов), после чего достоверность различий выборок с нормальным распределением оценивалась по параметрическому t-критерию (Стьюдента), при принятом уровне значимости 5% (двухсторонний тест), для выборок с равными или неравными дисперсиями (равенство дисперсий вычислялось по критерию Фишера). Для сравнения двух зависимых выборок (с попарно связанными вариантами) использовали парный двухвыборочный t-тест для средних значений (Фисенко Ф.П. и соавт., 2000). Для выборок с не нормальным распределением достоверность отличий рассчитывалась по непараметрическим критериям (критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона). Расчеты проводились при помощи программ IBM SPSS Statistic 20 и Microsoft Office Excel 2007.

## Г Л А В А 3.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. ВЛИЯНИЕ НООПЕПТА НА КРОВΟΣНАБЖЕНИЕ МОЗГА

Исследование нейропротекторных свойств ноопепта было начато с изучения его влияния на кровоснабжение головного мозга. С одной стороны известно, что ноотропный и нейропротекторный эффекты многих препаратов могут быть следствием позитивного влияния на мозговое кровообращение (Sutherland et al., 2011). С другой стороны, показано, что причиной недостаточной эффективности в клинических исследованиях многих потенциально эффективных на экспериментальных моделях нейропротекторов, помимо прочего, может являться то, что их эффекты зачастую не сопровождаются адекватным восстановлением кровоснабжения мозговой ткани (O'Collins V.E. et al., 2006; Feuerstein G.Z. et al., 2008). Между тем, залогом успешной терапии ишемических нарушений является восстановление нормальной функции сосудистого звена коррекцией мозгового кровотока в микроциркуляторном русле, сохранение целостности сосудов и минимизация нейрональной клеточной смерти (Zhang L. et al., 2012; Terasaki et al., 2014).

Принимая во внимание способность ноопепта оказывать положительное влияние на память и обучение при различных ишемических нарушениях (Островская Р.У. и соавт. 2001, 2002; Гаврилова С.А. 2006; Романова Г.А. и Шакова Ф.М., 2006), а так же способность некоторых эндогенных нейропептидов (VIP, PACAP, TRF, ИФР-1, PRR) и их глицин- и пролин- содержащих коротких аналогов (G-2mPE) положительно влиять на церебральную гемодинамику путем усиления мозгового кровотока (McCulloch J. and Kelly A.T. 1984; Koskinen L.D., 1986; Подопригора Г.М. и соавт., 2005; Баласанян М.Г. и соавт., 2012) и увеличения плотности капилляров мозга (Gustavsson M. et al., 2007), было исследовано влияние ноопепта на локальный мозговой кровоток и микроциркуляторное русло в условиях нарушения кровоснабжения мозга. Кроме того, ввиду того, что состояние системной

гемодинамики так же влияет на изменения ЛМК, было исследовано влияние ноопепта на величину системного АД и ЧСС.

### 3.1.1. Оценка влияния ноопепта на локальный мозговой кровоток в условиях нарушения кровоснабжения мозга

При исследовании влияния ноопепта на ЛМК в условиях его нарушения, было установлено, что односторонняя перевязка правой общей сонной артерии сопровождается статистически достоверным уменьшением величины мозгового кровотока ипсилатерального полушария (рис. 9), который к 30-ой минуте после окклюзии составляет в среднем ( $n=17$ )  $75.98 \pm 1,32\%$ , т.е. оказывается на  $24,02 \pm 1,32\%$  ( $p < 0,05$ ) ниже исходного значения.

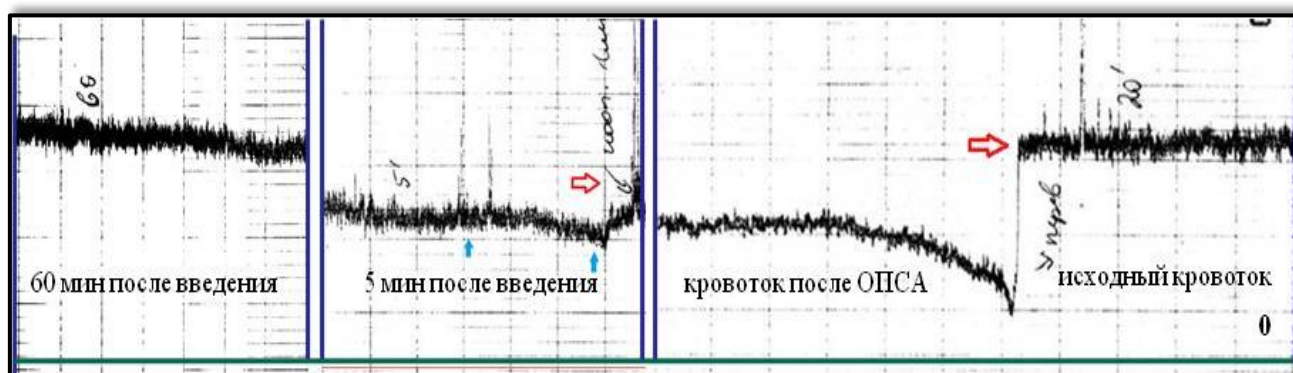


Рисунок 9. Регистрация изменений локального мозгового кровотока ипсилатерального полушария при окклюзии правой сонной артерии и после в/в введения ноопепта в дозе 1 мг/кг.

Перманентная окклюзия одной из общих сонных артерий является общепризнанным методом моделирования преходящих нарушений мозгового кровообращения у экспериментальных животных (Laas R. and Igloffstein J., 1983; Mendelov A.D. et al., 1984). Как известно, основным источником кровоснабжения мозга служат магистральные артерии — парные внутренние сонные и позвоночные, соединенные широким анастомозом являющимся главным резервом компенсации. В патологии, например при окклюзии одной из магистральных артерий кровь быстро перераспределяется и, при условии функциональной

полноценности виллизиева круга, кровоснабжение мозга может и не нарушиться (Edvinson L. and Krause D.N., 2002). Так, при выключении одной из внутренних сонных артерий, контралатеральная рефлекторно расширяется и кровоток в ней усиливается (Александрин В.В. и соавт., 2006). Однако нарушения мозгового кровообращения компенсируются за счет местных регуляторных механизмов лишь до определенных пределов. И, несмотря на то, что коллатеральная циркуляция после перманентной окклюзии одной из сонных артерий в состоянии поддерживать церебральный кровоток выше критического уровня (Omae T. et al., 2000), тем не менее, у многих экспериментальных животных (кошки, крысы) наблюдается его снижение по сравнению с исходным значением. Так, согласно литературным данным перевязка правой общей сонной артерии у крыс приводит к статистически достоверному снижению МК как в ипсилатеральном, так и интактном полушариях (Ley G.D. et al., 1985), особенно первые 24 часа, после ишемии, когда компенсаторный резерв еще не полностью реализован.

*Таблица 1.*

*Значения ЛМК (в относительных единицах) ипсилатерального полушария мозга крыс (n=6) после введения ноопепта в дозе 1 мг/кг, на фоне окклюзии правой общей сонной артерии (M±SD).*

<b>Исх. уровень</b>	<b>ОПСА</b>	<b>время (мин) после введения</b>			
		<b>30 мин</b>	<b>60 мин</b>	<b>80 мин</b>	<b>90 мин</b>
25,75±8,68	20,85±8,13*	23,13±8,33**	25,4±8,96**	25,53±8,91**	25,5±8,99**

*\*p<0,05-по сравнению с исходным уровнем, \*\*p<0,05-по сравнению с ОПСА*

*Здесь и далее: **Исх. уровень** – величина исследуемого параметра до моделирования ишемии*

***ОПСА**- величина исследуемого параметра после оперативного вмешательства*

Как показали результаты проведенных исследований, при внутрибрюшинном введении ноопепта в дозе 1мг/кг, на фоне сниженного после перевязки правой сонной

артерии мозгового кровотока, было зарегистрировано положительное влияние препарата на церебральную гемодинамику, выразившееся в постепенном увеличении ЛМК на протяжении всего времени регистрации (таб. 1). Причем, при введении препарата на фоне сниженного на  $19,76 \pm 2,3\%$  (по сравнению с исходным уровнем) кровотока, в течение первых 20 минут величина ЛМК у различных животных данной группы изменялась неоднозначно: постепенное увеличение церебрального кровотока с первых минут после введения препарата наблюдалось лишь у 33,4% ишемизированных животных, тогда как в 16,7% случаях регистрируемые изменения МК носили не стабильный характер. Статистически значимое, постепенное увеличение ЛМК у всех животных в группе наблюдалось с 30-ой минуты после введения препарата.

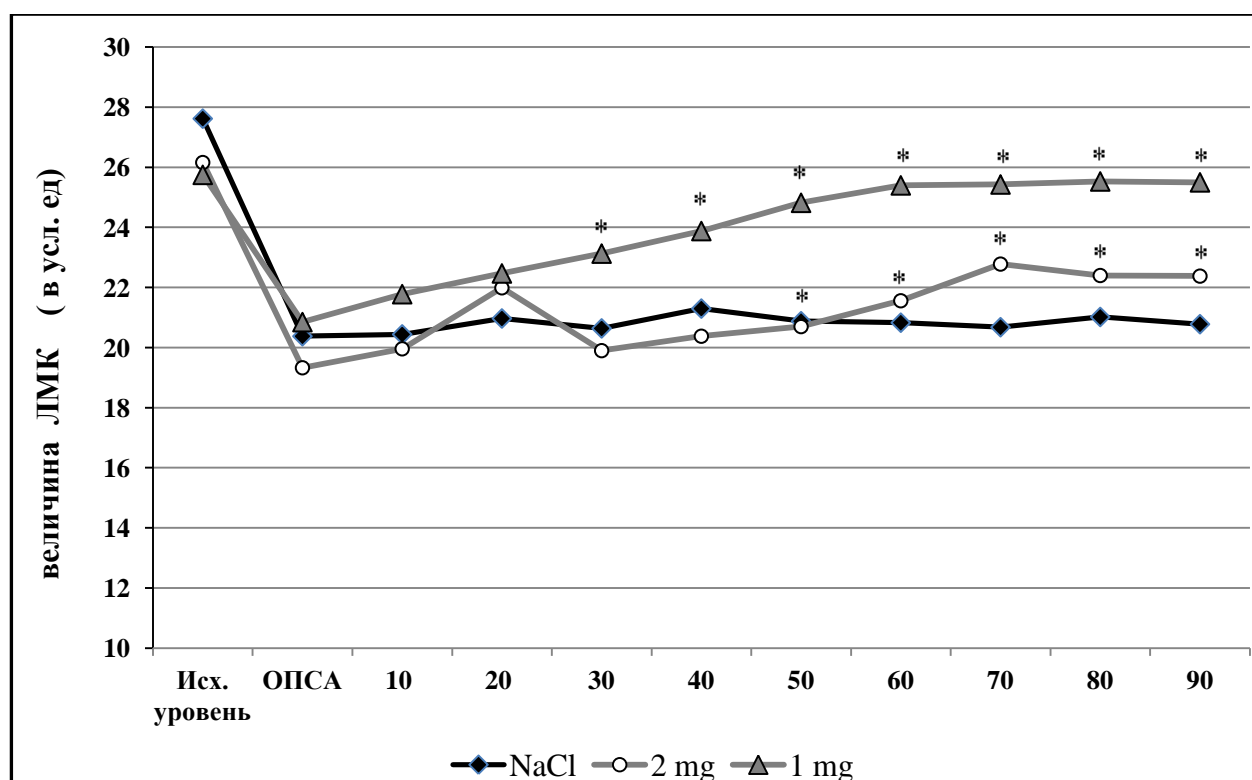


Рисунок 10. Динамика изменений локального мозгового кровотока после внутрибрюшинного введения ноопета в дозах 1 мг/кг и 2 мг/кг на фоне ОПСА (n=17)

\* $p < 0,05$ - по сравнению с ОПСА

Причем, максимальное значение величины МК было зарегистрировано к 60-ой минуте введения препарата, составляя  $23,68\% \pm 2,45$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с перевязкой.

Восстановленный почти до исходного уровня ( $98,6\pm 3,17\%$ ) кровотока стабильно сохранялся вплоть до 90-ой минуты после введения препарата (рис. 10). Следует так же отметить, что при введении препарата в дозе  $0,5\text{ мг/кг}$  наблюдались идентичные изменения МК.

В следующей серии экспериментов введение ноопепта в дозе  $2\text{ мг/кг}$  на фоне сниженного на  $26,54\%\pm 2,06$  ЛМК, не вызвало столь значимых изменений (таб. 2).

Таблица 2

*Изменения ЛМК (в относительных единицах) ипсилатерального полушария крыс ( $n=6$ ) после введения ноопепта в дозе  $2\text{ мг/кг}$ , на фоне окклюзии правой общей сонной артерии ( $M\pm SD$ ).*

Исх. уровень	ОПСА	время (мин) после введения			
		30 мин	60 мин	80 мин	90 мин
$26,16\pm 4,21$	$19,32\pm 3,9^*$	$19,9\pm 4,37$	$21,56\pm 5,0^{**}$	$22,4\pm 5,68^{**}$	$22,38\pm 5,65^{**}$

*\* $p<0.05$ -по сравнению с исходным уровнем, \*\* $p<0.05$ -по сравнению с ОПСА*

Максимальное увеличение величины мозгового кровотока на  $17,07\pm 2,57\%$  ( $p<0,05$ ) в этом случае наблюдалось к 70-ой минуте эксперимента, после чего отмечалось тенденция к понижению величины МК, изменения которого к 90 минуте составили  $15,06\pm 2,97\%$  ( $p<0,05$ ). Обращает на себя внимание тот факт, что в данной группе животных изменения ЛМК под действием указанной дозы носили не стабильный характер (рис. 10). И, в отличие от группы животных получавших ноопепт в дозе  $1\text{ мг/кг}$ , статистически значимое увеличение величины МК регистрировалось лишь к 50-й минуте после введения препарата. Как видно из графика (рис. 10) колебания величины МК сохранялись вплоть до 90 мин после введения ноопепта. При этом, что в отличие от животных, получавших ноопепт в дозе  $1\text{ мг/кг}$ , при введении препарата в дозе  $2\text{ мг/кг}$  восстановления МК не наблюдалось даже к концу эксперимента (рис. 11).

Следует отметить, что изменения мозгового кровотока после введения ноопепта как в дозе  $1\text{ мг/кг}$ , так и  $2\text{ мг/кг}$  достоверно отличались от данных контрольной группы, животным которой, после перманентной окклюзии правой общей сонной артерии на фоне сниженного



на  $26,18 \pm 0,93\%$  кровотока, вводился в/б изотонический раствор хлорида натрия (рис. 10). Как видно из таб. 3, в течение 90 минут после введения физиологического раствора, величина ЛМК ипсилатерального полушария не претерпевала статистически значимых изменений, и оставалась достоверно сниженной по сравнению с нормой до перевязки.

Таблица 3

*Изменения ЛМК (в относительных единицах) ипсилатерального полушария крыс (n=5) после введения 0.9% р-ра хлорида натрия, на фоне окклюзии правой общей сонной артерии (M±SD)*

Исх. уровень	ОПСА	время (мин) после введения			
		30 мин	60 мин	80 мин	90 мин
27,64±3,73	20,38±2,78*	20,64±2,24*	20,83±3,17*	21,03±3,08*	20,78±2,81*

\* $p < 0.05$ -по сравнению с исходным уровнем

Полученные результаты согласуются с литературными данными, которые свидетельствуют о том, что антиамнестический эффект ноопепта проявляется в интервале доз от 0,5 до 1 мг/кг (Островская Р.У., 2003), а при увеличении дозы наблюдается снижение и даже исчезновение (1,2 мг/кг) указанной активности, которая, однако, снова проявляется при более высоких дозах (5, 10, 20 мг/кг).

Дальнейшее увеличение дозы препарата (5, 10 мг/кг) в наших экспериментах не привело к ощутимым различиям в эффектах ноопепта на ЛМК по сравнению с дозой 1мг/кг, в связи чем, в последующих опытах была выбрана дозировка 0,5-1мг/кг внутривенно.

Таким образом, результаты по исследованию влияния ноопепта на ЛМК свидетельствуют о том, что препарат обладает способностью улучшать нарушенный церебральный кровоток в условиях ОПСА. Влияние ноопепта на мозговой кровоток зависит от введенной дозы препарата. Оптимальной в отношении цереброваскулярной активности оказалась доза 1 мг/кг, которая практически приводит к восстановлению ЛМК (рис. 11) При дальнейшем увеличении дозы до 2 мг/кг эффективность препарата не только не увеличивалась, но и оказалась менее выраженной по сравнению с указанной дозой.

Полученные результаты согласуются с литературными данными относительно куполообразного характера действия ноотропных препаратов в целом и ноопепта в частности, максимальный ноотропный и нейропротективный эффект которого проявляется в дозе 0.5-1 мг/кг. Следует отметить, что для веществ в реализации действия которых вовлечены пептидергические механизмы характерна такая куполообразная зависимость доза-эффект.

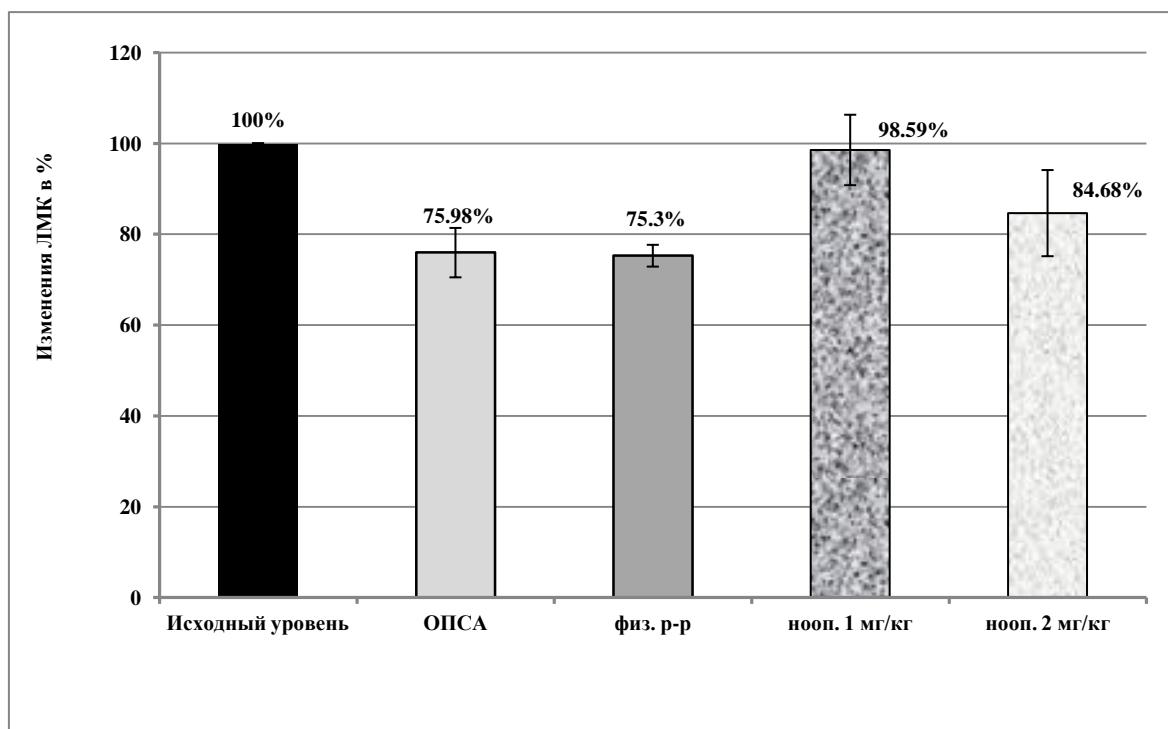


Рисунок 11. Влияние ноопепта в дозе 1 мг/кг и 2 мг/кг на ЛМК в условиях окклюзии правой общей сонной артерии (в % от исходного значения,  $M \pm \sigma_m$ ) ( $n=17$ )

### 3.1.2. Исследование влияния ноопепта на системное артериальное давление и ЧСС.

При оценке эффективности вазоактивных соединений большое значение, как известно, придается характеру их влияния на системное артериальное давление. Хотя ауторегуляция мозгового кровотока является физиологическим механизмом, поддерживающим постоянство церебрального кровотока, при достижении ее границ

(нижних или верхних) соотношение между системным АД и объемным кровотоком принимает линейный характер (Александрин В.В., 2000).

В связи с этим, в следующей серии экспериментов проводилось определение систолического и диастолического давления и частоты сердечных сокращений у бодрствующих крыс после однократного введения ноопепта в дозе 1 мг/кг в течение 90 минут. Продолжительность времени регистрации, и дозировка препарата были выбраны исходя из результатов предыдущей серии экспериментов, по исследованию влияния ноопепта на ЛМК в условиях ОПСА.

Результаты проведенных экспериментов показали, что однократное введение препарата в указанной дозе не приводит к существенному, статистически значимому изменению системного артериального давления (по сравнению с исходным значением), после инъекции ноопепта, у животных на протяжении всего времени регистрации (рис. 12).

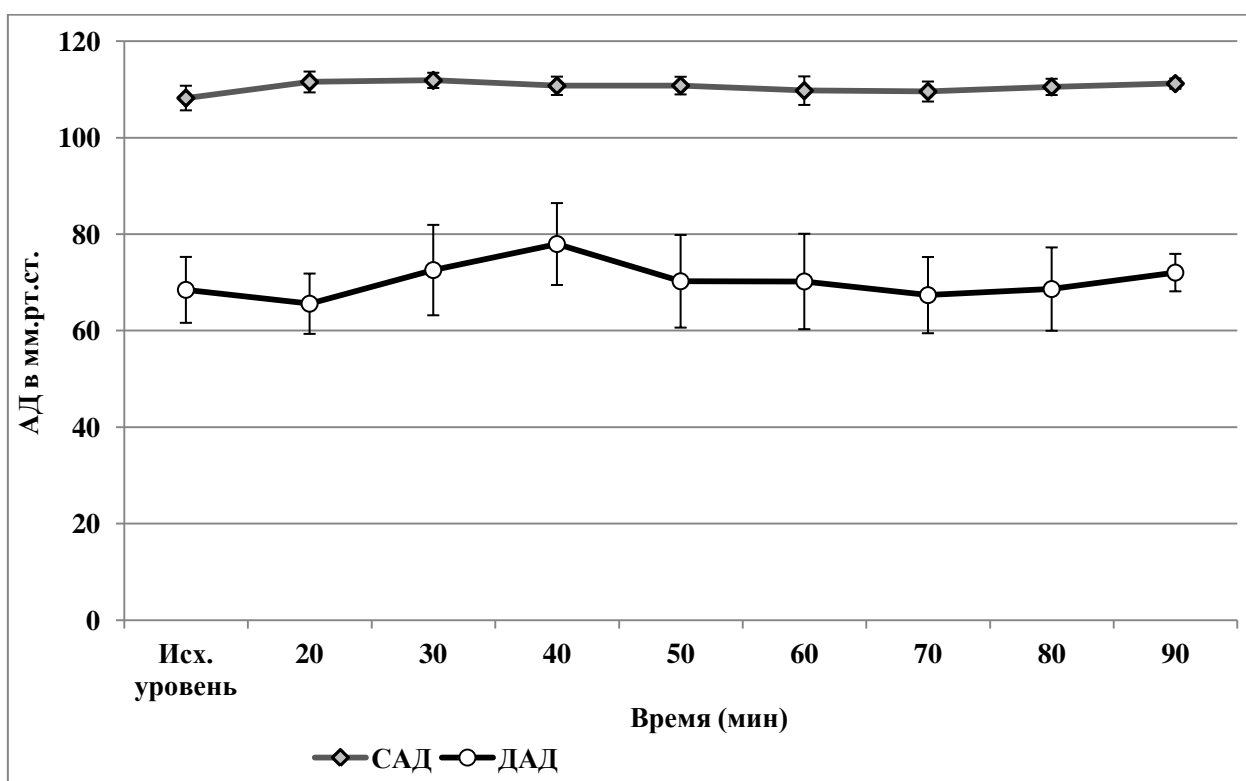


Рисунок 12. Влияние ноопепта на динамику САД и ДАД крыс при однократном в/б введении в дозе 1мг/кг. (n=6) (M±m).

Так, например колебания величины систолического АД (таб.4), так же как и их среднее значение  $110,7 \pm 1,22$  мм.рт.ст., практически не имели статистически значимых

отличий от контрольного (исходного) САД, которое до введения ноопепта составляло в среднем  $108,23 \pm 2,55$  мм.рт.ст. Аналогичная картина наблюдалась и при мониторинге диастолического артериального давления, контрольное (исходное) среднее значение которого было в пределах  $68,47 \pm 6,83$  мм.рт.ст, а к концу эксперимента составило  $70,74 \pm 2,48$  мм.рт.ст. Что касается частоты сердечных сокращений, то она так же не претерпевала статистически достоверных отклонений от среднего значения до введения препарата.

Таблица 4.

*Влияние ноопепта в дозе 1 мг/кг на динамику изменений систолического и диастолического давлений и частоту сердечных сокращений (n=6) (M±σ<sub>x</sub>)*

Исследуемый параметр	Исх. уровень	Время (мин) после введения ноопепта в дозе 1 мг/кг			
		30	50	70	90
САД	108,2±2,0	111,9±1,3 <sup>#</sup>	110,8±1,5 <sup>#</sup>	109,6±1,7 <sup>#</sup>	111,2±1,2 <sup>#</sup>
ДАД	68,5±5,5	72,6±7,5 <sup>#</sup>	70,3±7,7 <sup>#</sup>	67,4±6,3 <sup>#</sup>	72,05±4,4 <sup>#</sup>
ЧСС	347,2±17,2	344,1±41,7 <sup>#</sup>	319,4±17,1 <sup>#</sup>	310,5±21,1 <sup>#</sup>	315,0±12,9 <sup>#</sup>

*#- p > 0,05 по сравнению с исходным уровнем,  
САД – систолическое артериальное давление,  
ДАД – диастолическое артериальное давление,  
ЧСС – частота сердечных сокращений*

На основании полученных результатов можно заключить, что ноопепт при однократном введении в дозе 1 мг/кг не вызывает к изменению системного артериального давления. Таким образом, стимулирующее влияние ноопепта на кровоснабжение мозга, не опосредовано изменениями системной гемодинамики.

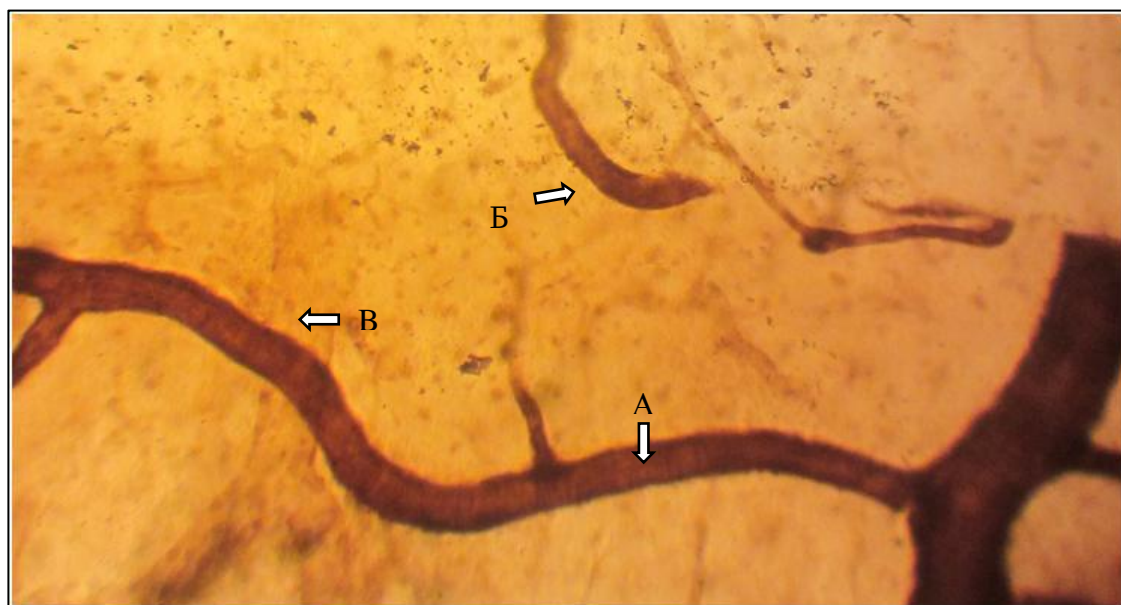
### **3.1.3. Влияние ноопепта на морфофункциональное состояние капиллярной системы головного мозга крыс в условиях нарушения кровоснабжения.**

Результаты предыдущей серии экспериментов относительно способности ноопепта в дозе 1 мг/кг восстанавливать до исходного значения нарушенный в условиях перманентной окклюзии общей сонной артерии мозговой кровотоков, послужили основой для изучения его влияния на состояние микроциркуляторного русла коры головного мозга в аналогичных

условиях. Ведь именно состояние капиллярной системы головного мозга (через обширную поверхность которой осуществляется обмен газов и питательных веществ) является одним из важных факторов, играющих ключевую роль в адекватном снабжении тканей кислородом и обеспечивающих метаболические потребности мозга (Karbowski J. 2011; Østergaard L. et al., 2013), как в норме, так и патологии. Кроме того, общеизвестно, что при ишемии, даже после реперфузии, имеют место вторичные нарушения, такие как отсроченная вторичная гипоперфузия, известная так же как “феномен невосстановленного кровотока” (no-reflow) (Гусев Е. и Скворцова В., 2001), в основе патогенеза которого лежат постишемический застой кровообращения с тромбообразованием в посткапиллярных венах, активация лейкоцитов, приводящий к увеличению вязкости крови и снижению мозгового кровотока (Petty M.A. and Wettstein J.G., 2001; del Zoppo G.J. and Mabuchi T, 2003). Особое место занимает так же морфофункциональное состояние различных звеньев микроциркуляторного русла, в частности капилляров и прекапиллярных артериол (Hauk E. et al., 2004). Необходимость исследования микроциркуляторного русла диктуется тем, что восстановление мозгового кровотока после ишемических повреждений не всегда сопровождается полной реперфузией в ишемизированной зоне и выживаемость тканей особенно в зоне “пенумбры” (ишемической полутени) напрямую зависит от того, насколько эффективно капиллярная сеть обеспечивает адекватную поставку кислорода.

Исследование влияния ноопепта на капилляры ипсилатерального и контралатерального полушарий коры головного мозга крыс на фоне перманентной ОПСА, было осуществлено безинъекционным кальций аденозинтрифосфатным методом по А. М. Чилингаряну (1977 г). Морфометрическое исследование влияния ноопепта на капилляры полушарий коры головного мозга крыс проводились в трех группах животных. Крысам экспериментальной группы (n=9), через 30 мин после ОПСА, в/б вводили ноопепт в дозе 1 мг/кг и подвергали декапитации через 60 минут после введения препарата. Животным контрольной группы (n=9) через 30 минут после ОПСА вводился 0,9% раствор хлорида натрия. Срезы коры головного мозга интактных животных (n=8) использовались для сравнения полученных данных. Временной интервал для введения дипептида, а так же декапитации животных был выбран исходя из результатов, описанных в предыдущей главе.

Для количественной и качественной оценки состояния микроциркуляторного русла рассчитывали средний диаметр капилляров (в мкм), количество функционирующих (4-10 мкм), суженных (4-2,5 мкм) и проницаемых только для плазмы крови (<2,5 мкм) капилляров, а так же распределение капилляров по диаметру (в % от общего числа).

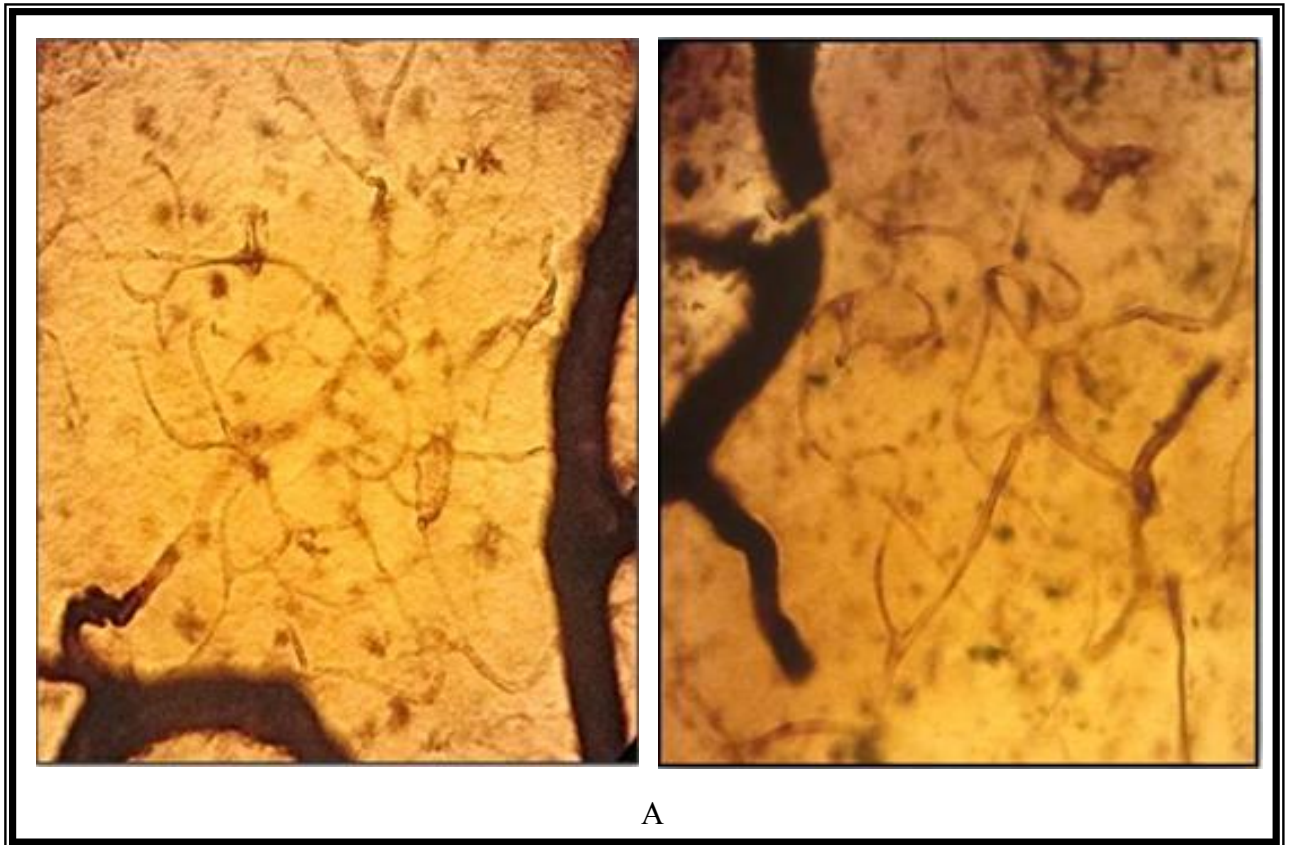


*Рисунок 13. Пиальные сосуды коры головного мозга крыс в норме*

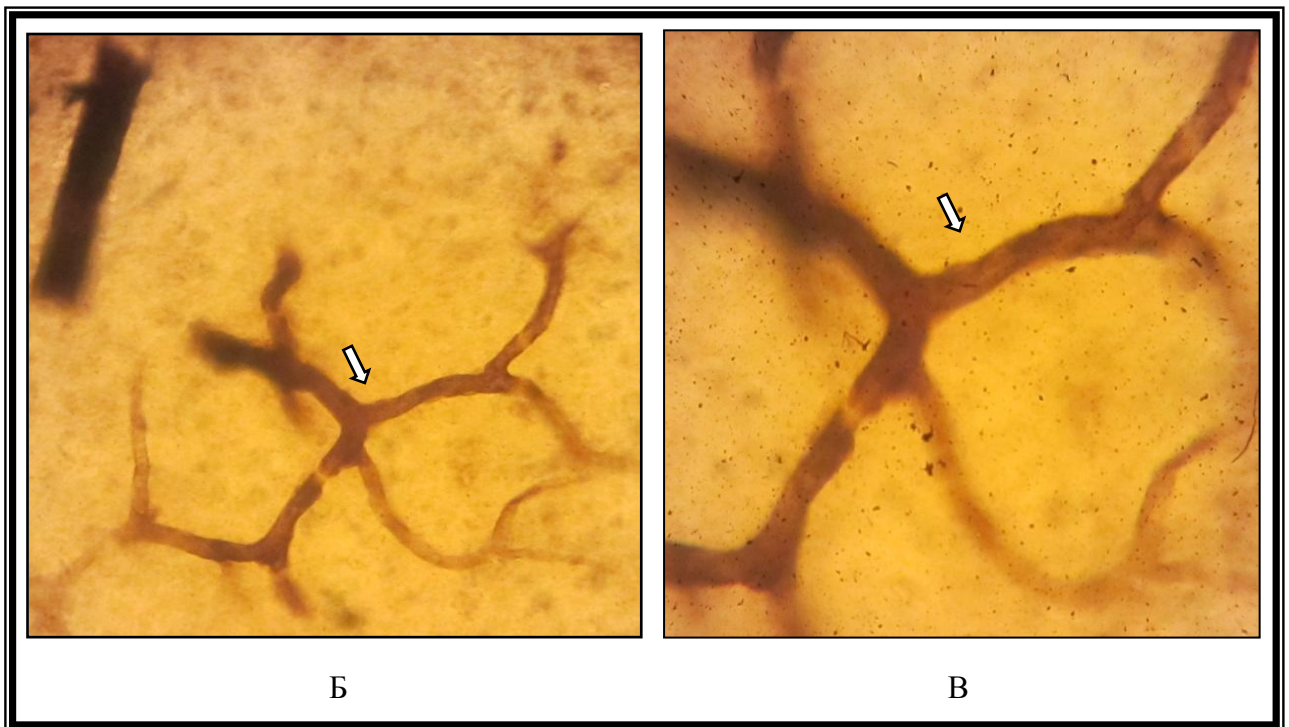
*А, Б – артерии и артериолы с окрашенными элементами гладкомышечных клеток, В – вены с менее интенсивной окраской (ок. 15 об.10)*

Как подтвердили результаты проведенных исследований, безинъекционный кальций аденозинтрифосфатный метод позволяет четко дифференцировать различные звенья микроциркуляторного русла.

Как видно из рисунков 13 и 14, на срезах мозга контрастно и избирательно окрашивается сосудисто-капиллярная сеть. Причем, артерии и артериолы можно различить по окрашенным элементам гладкомышечных клеток (рис. 13 -А, Б), количество которых в прекапиллярных артериолах постепенно уменьшается, а в капиллярах, в отсутствии



A



Б

В

*Рисунок 14. Капиллярная сеть головного мозга крыс в норме*

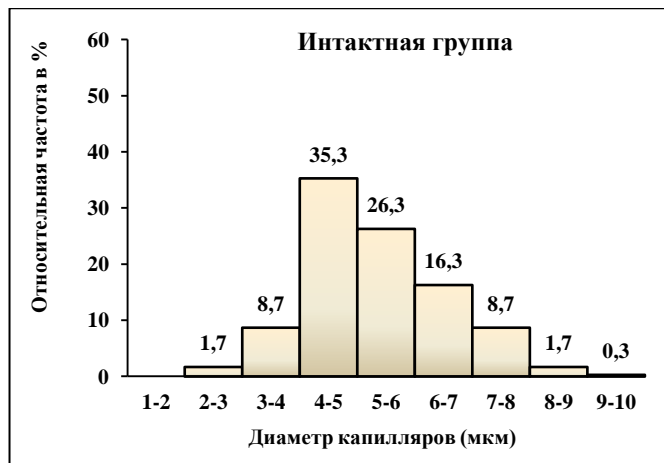
*A — ок. 15, об.10, Б — ок.15 об.20, В — ок.15 об.40*

гладкомышечных клеток, равномерно окрашивается только эндотелий сосудов (рис. 13 - Б, В). Посткапиллярные венулы и вены различают по менее интенсивной окраске (рис. 13 - В).

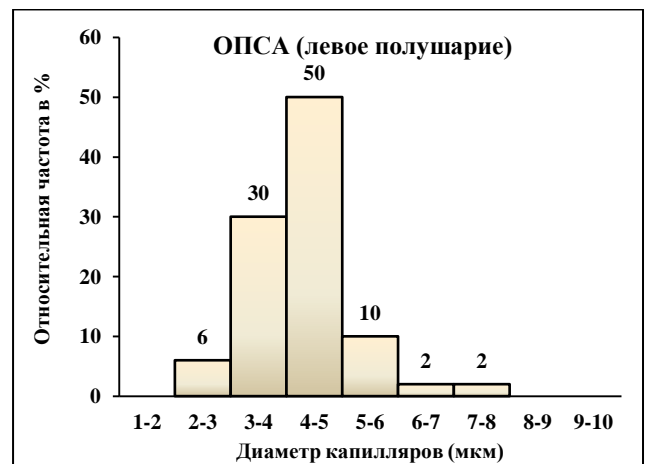
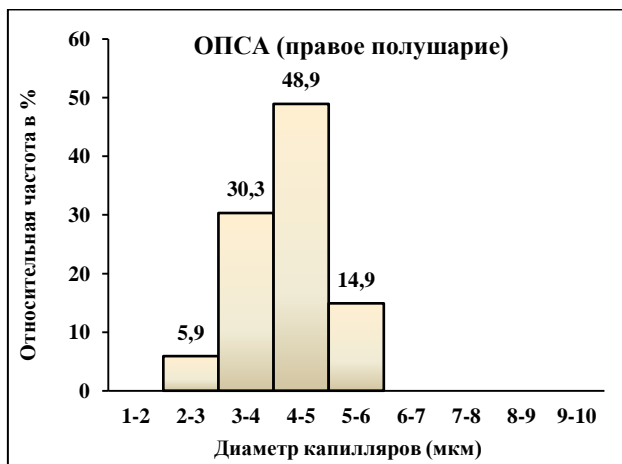
Как показали данные морфометрических исследований в срезах головного мозга крыс интактной группы, большинство капилляров (89,3%) находится в функционально активном состоянии (рис. 8), а их средний диаметр колеблется в пределах  $5,55 \pm 0,06$  мкм (таб. 5), что подтверждает многочисленные литературные данные, свидетельствующие о том, что в мозге большинство капилляров находится в открытом состоянии (Топчян А.В., 1998; Tata D.A. and Anderson B.J., 2002; Cortes-Sol A. et al., 2013) и не испытывает попеременного сужения или расширения, как в сосудистой системе других органов. Помимо незначительного количества (10,0%) суженных капилляров, в некоторых полях зрения наблюдались единичные капилляры проницаемые только для плазмы крови (0,7% от общего количества). Примечательно, что распределение функционирующих капилляров по диаметру (рис. 15 а) охватывает довольно широкий диапазон значений, от 4 до 9 мкм, где 26,3% и 16,3%, составляют капилляры диаметром 5-6 мкм и 6-7 мкм соответственно.

При исследовании состояния микроциркуляторного русла коры головного мозга крыс в условиях ишемии было установлено, что перманентная окклюзия правой сонной артерии приводит к заметным нарушениям в капиллярном сосудистом русле как ипсилатерального, так и контралатерального полушарий головного мозга крыс. Прежде всего, отмечается статистически значимое уменьшение диаметра функционирующих капилляров на 16,4% (от  $5,55 \pm 0,06$  до  $4,64 \pm 0,04$  мкм) в правом и на 15,0% (от  $5,55 \pm 0,06$  до  $4,71 \pm 0,07$  мкм) в левом полушарии ( $p < 0,05$ ). Достоверное увеличение количества суженных капилляров, от 10% до 33,3% в правом и до 34% в левом полушарии, от общего количества, так же подтверждает развитие наблюдаемых ишемических нарушений. Количество капилляров проницаемых только для плазмы крови увеличивалось незначительно, от 0,7% до 2,7% в правом и до 2,05% в левом полушариях, и носило недостоверных характер. Что касается относительного распределения капилляров по диаметру, то, как видно из рисунка 15 б, при ОПСА резко уменьшается количество функционирующих капилляров диаметром 5-6 мкм (в правом полушарии 14,9%, в левом - 10% от общего количества), в отличие от сосудов диаметром 4-

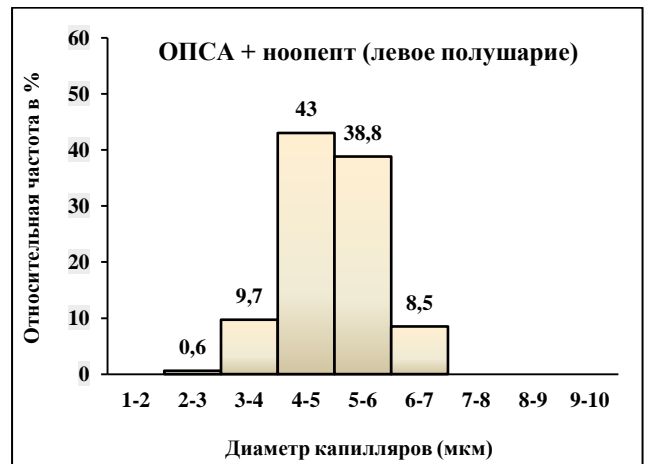
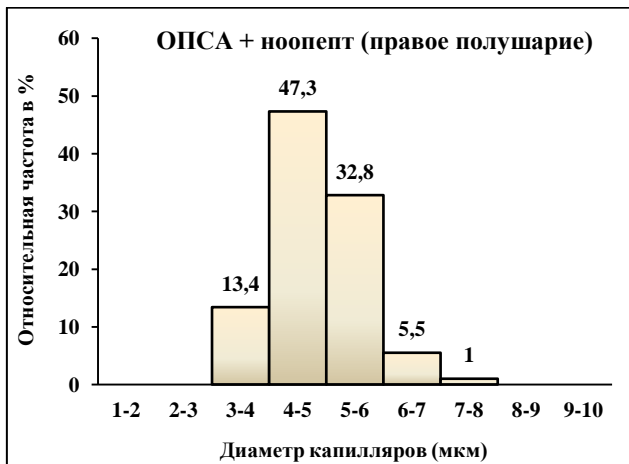




а



б



в

Рисунок 15. Частота распределение (% от общего количества) капилляров головного мозга крыс по диаметру в норме (а), при ОПСА (б) и при в/б введения ноопепта в дозе 1 мг/кг на фоне окклюзии правой сонной артерии (в).

5 мкм (в правом полушарии 48,9%, в левом – 50,0% от общего количества). Капилляры диаметром более 6 мкм в срезах ипсилатерального полушария полностью отсутствовали, а в микропрепаратах контралатерального полушария обнаруживались в незначительном количестве (4%).

Полученные результаты согласуются с литературными данными относительно нарушений наблюдаемых в микроциркуляторном звене сосудистого русла при нарушениях кровоснабжения мозга (Taguchi Y. et al., 2004) и постишемической отсроченной гипоперфузии (Наук Е.Ф. et al., 2004). Интерпретация наблюдаемых изменений в различных исследованиях не одинакова и вопросы о механизмах развития отмечаемых сдвигов остаются открытыми. Согласно классическим представлениям, капилляры, стенки которых лишены гладкомышечных клеток, не способны к самостоятельному сужению или расширению, и изменение их диаметра это пассивный процесс, происходящий под влиянием различных факторов. Во-первых, это результат изменения тонуса более крупных сосудов, в частности сужение прекапиллярных артериол и, как следствие этого, уменьшение величины

Таблица 5.

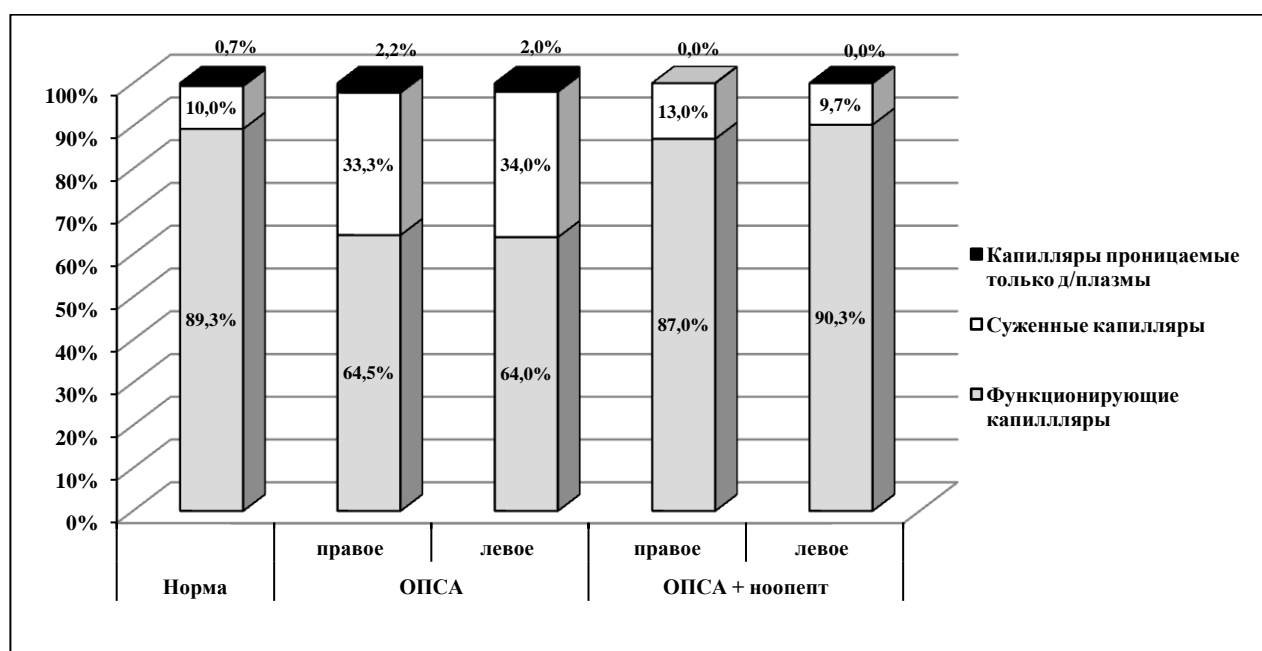
*Диаметр капилляров ипсилатерального и контралатерального полушарий головного мозга крыс после ОПСА и на фоне однократного внутрибрюшинного введения ноопепта в дозе 1 мг/кг (мкм,  $M \pm \sigma_x$ ).*

Капилляры	Интактная группа $n_1=300$	ОПСА		ОПСА + ноопепт	
		Правое $n_2=186$	Левое $n_3=150$	Правое $n_4=200$	Левое $n_5=150$
Функционирующие	5,55±0,06	4,64±0,04*	4,71±0,07*	5,01±0,05* #	5,07±0,05* #
Суженные	3,61±0,07	3,48±0,04	3,5±0,09	3,68±0,04#	3,49±0,08
Проницаемые только д/плазмы	2,41±0,01	2,19±0,09*	2,45±0,0	0	0

\*-  $p < 0,05$  по сравнению с нормой, # -  $p < 0,05$  по сравнению с ОПСА,

$n_1, n_2, n_3, n_4, n_5$  – общее количество измеренных сосудов

соотношения капиллярный кровоток/диаметр. Во-вторых—это уменьшение диаметра капилляров вследствие постишемического набухания микроворсинок эпителия и перикапиллярной глии, венозный застой вследствие тромбоза и закупорки посткапиллярных вен, а так же лейкоцитоза (Zhang L. et al., 2012; Sutherland et al., 2011) и т.д. Тем не менее, ряд авторов, основываясь на результатах собственных исследований, полагают, что изменения диаметра капилляров все же активный процесс, включающий и эндотелиальный компонент. Так, есть свидетельства указывающие на наличие в самом эндотелии сосудов актин/миозин сократительных систем, реагирующие на различные вазоактивные субстанции: например F-актиновые волокна эндотелия капилляров мозга, в активации которых задействованы изменения концентрации внутриклеточного кальция (ElAli A. et al, 2014). Некоторыми исследователями показана роль сократительных перicyтов в регуляции диаметра капилляров, как в норме, так и при ишемии (Hall et al., 2014; Yemisci et al., 2009).



*Рисунок 16. Влияние ноопепта в дозе 1 мг/кг при внутрибрюшинном введении на процентное соотношение количества функционирующих, суженных и проницаемых только для плазмы капилляров головного мозга крыс после перманентной окклюзии правой сонной артерии*

При исследовании влияния ноопепта на морфофункциональное состояние капиллярной

системы коры головного мозга крыс на фоне ОПСА было установлено, что последний, обладает способностью устранять нарушения в данном звене микроциркуляторного русла, путем статистически достоверного по сравнению с контролем увеличения процента функционирующих капилляров как ипсилатерального, так и контралатерального, полушарий (рис. 16) практически до исходного значения (87.0% в правом и 90.3% в левом). Приведенные данные подтверждаются и статистическим анализом, свидетельствующим о том, что различия значений между данными экспериментальной (получавшей ноопепт) и интактной группами животных недостоверны, что лишний раз говорит в пользу того, что под действием ноопепта происходит коррекция нарушений в микроциркуляторном русле.

Положительное влияние ноопепта на микроциркуляторное русло подтверждается так же достоверным увеличением диаметра функционирующих капилляров в срезах правого и левого полушарий на 7,9% и 7,6% (таб. 5), до значений  $5,01 \pm 0,69$  и  $5,07 \pm 0,65$  мкм ( $p < 0.05$ ) соответственно. Следует отметить, что хотя диаметр функционирующих капилляров не достигал своего исходного значения, тем не менее, при оценке относительной частоты распределения капилляров по диаметру, становится очевидными, что ноопепт существенно увеличивает количество сосудов диаметром более 5 мкм (рис. 15 в), причем указанное действие наиболее выражено в контралатеральном полушарии. Немаловажным является и то, что ни в одном из полей зрения в срезах группы животных получавших ноопепт не выявлялись сосуды диаметром менее 2,5 мкм.

По-существу, результаты экспериментов показали, что способность ноопепта увеличивать локальный мозговой кровоток обусловлена его воздействием на микроциркуляторное русло коры головного мозга крыс.

\*\*\*

Обобщая результаты проведенных исследований по оценке влияния ноопепта на кровоснабжение мозга при нарушениях вызванных перманентной односторонней окклюзией сонной артерии, можно заключить, что ноопепт в дозе 1 мг/кг обладает способностью восстанавливать нарушенный мозговой кровоток и улучшать микроциркуляцию коры головного мозга, без существенного влияния на величину системного артериального давления.

### **3.2. НООПЕПТ В ПРЕДОТВРАЩЕНИИ НЕЙРОПОВЕДЕНЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ ЛОКАЛЬНО-ИШЕМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ МОЗГА**

Для клинической оценки результатов терапии инсульта важное значение имеют психоневрологические последствия цереброваскулярных расстройств (Fisher M. et al., , 2009; Schaar K.L. et al., 2010, Minnerup J. et al., , 2012). В связи с этим для оценки эффективности ноопепта в устранении ишемических нарушений было исследовано его влияние на развитие тревожности, нарушений двигательной активности и моторной координации в условиях локальной ишемии мозга, вызванной окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА), с оценкой способности препарата предотвращать нарушения памяти и процессы обучения животных.

При экспериментальном исследовании соединений с нейропротекторной активностью очень важным является адекватное клиническим проявлениям моделирование локальной ишемии. С этой целью наш выбор был остановлен на широко применяемой модели окклюзии средней мозговой артерии у грызунов (Woodruff T.M. et al., , 2011; Colak G. et al., , 2011), поскольку, благодаря обширной коллатеральной циркуляции у крыс, очевидно, что окклюзия одной каротидной артерии, даже в сочетании с гипоксией или снижением системного артериального давления, не может привести к выраженным изменениям и вызвать типичные для ишемии нарушения метаболизма и функции мозга (Chen S.T. et al., , 1986). Перевязка же интракраниальных мозговых сосудов может способствовать развитию повреждений, типичных для большинства клинических проявлений цереброваскулярных нарушений (Романова Г. и Шакова Ф., 2006). Учитывая, что область, кровоснабжаемая средней мозговой артерией, довольно значима, по сравнению с регионами, снабжаемыми передней и задней мозговыми артериями, окклюзия СМА, в зависимости от локализации может привести к нарушению кровоснабжения не только корковых структур, но и подкорковых образований (Courtney de V.A. et al., , 2001). Так, по данным различных авторов, перевязка средней мозговой артерии у крыс приводит к развитию инфаркта в области

базальных ганглиев, соматосенсорной коры и лимбических структур (Tamura A. et al., 1981; Menzies S. et al., 1992). Исследователи также отмечают, что при перманентной окклюзии средней мозговой артерии у крыс имеет место длительно сохраняющийся двигательный и когнитивный дефицит.

Среди описанных в литературе моделей окклюзии средней мозговой артерии модель, предложенная Tamura et al., (1981) в модификации Топчяна А. (1997) имеет ряд преимуществ. Во-первых, данная модель, предлагающая перевязку средней мозговой артерии на уровне ее проксимальной части, охватывает довольно большую область нарушений. Во-вторых, смертность животных в этом случае сравнительно ниже и приводит к нарушению, которое обычно поражает лобно-теменную кору по всей ее толщине (Баласаян М.Г., 2003). Несмотря на большое разнообразие экспериментальных методов воспроизводящих ишемический инсульт, ОСМА у грызунов рассматривается как наиболее приближенная к клиническим проявлениям модель (Tamura A., 1981; Courtney de V.A., 2001). Исходя из выше изложенного, в качестве экспериментальной модели локальной ишемии была выбрана проксимальная окклюзия средней мозговой артерии (ОСМА),.

Учитывая тот факт, что хорошо очерченный ишемический некроз формируется на 3-6-е сутки микроциркуляторно-клеточного каскада (Гусев Е. и Скворцова В., 2001) и согласно ранее проведенным экспериментальным исследованиям, полное формирование ишемического очага у оперированных крыс отмечается на 6-е сутки после проксимальной перевязки средней мозговой артерии (Топчян А.В., 1998), все эффекты ноопепта в условиях локальной ишемии, были исследованы через 6 суток после ОСМА, а также в более отдаленные сроки ишемии – через 12 дней.

### **3.2.1. Влияние ноопепта на поведение крыс в тесте «открытое поле».**

Учитывая широкую вариабельность поведенческих характеристик у беспородных крыс, для последующих экспериментов по изучению памяти и поведения, проводилась предварительная отборка животных в тесте «Открытое поле» (ОП). Для этого до перевязки

средней мозговой артерии крыс подвергали тестированию в ОП и в качестве основного параметра поведения использовали уровень общей двигательной активности (ОДА). Из широкой популяции животных (n=98) были отобраны крысы с высокой и средней двигательной активностью (n=60), поведение которых характеризовалось относительно высоким уровнем как периферической (ПДА), так и вертикальной (ВДА) активности (ОДА выше 10-ти) и относительно низким количеством актов дефекаций. Животные с меньшими показателями (ниже 10-ти) исключались из дальнейших экспериментов. Отобранные животные после окклюзии средней мозговой артерии проходили дальнейшее тестирование в ОП (n=30), а также приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) (n=30). Показатели двигательной активности и эмоциональности отобранных для дальнейшего исследования в ОП животных приведены в таблицах 6 (а) и 6 (б).

Таблица 6 (а).

*Параметры поведения крыс в "открытом поле" после ОСМА на фоне ежедневного внутрибрюшинного введения ноопепта в дозе 0,5 мг/кг, на 6-е сутки после моделирования локальной ишемии ( $M \pm \sigma_m$ ).*

Параметры открытого поля	через 6 суток после ОСМА		
	Исх. уровень (n=30)	ОСМА (n=12)	ОСМА + ноопепт (n=18)
ПДА	30,23±4,68	4,83±1,56 (P <sub>1</sub> *)	16,17±6,36 (P <sub>2</sub> *)
ЦА	0,43±0,37	0 (P <sub>1</sub> *)	0,78±0,9
ВДА	7,07±1,82	1,0±0,42 (P <sub>1</sub> *)	2,56±1,44 (P <sub>2</sub> *)
ОДА	37,73±5,92	5,83±1,8 (P <sub>1</sub> *)	19,5±7,82 (P <sub>2</sub> *)
КАД	1,73±0,51	1,83±0,79	1,67±0,65
КАГ	1,37±0,53	0,25±0,35 (P <sub>1</sub> *)	1,94±0,90 (P <sub>2</sub> *)

\*-  $p < 0,05$ , # -  $p > 0,05$ , P<sub>1</sub> – по сравнению с базовым уровнем, P<sub>2</sub> – по сравнению с ОСМА

Результаты экспериментальных исследований показали, что при ОСМА у всех животных контрольной группы на 6-е сутки после оперативного вмешательства наблюдалось выраженное, статистически значимое снижение общей двигательной активности (на 84,6% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с исходным уровнем) по всем оцениваемым параметрам (таб. 6 (а)).

Дисперсионный анализ параметров, характеризующих поведение крыс в тесте ОП, показал, что в/б введение ноопепта в дозе 0,5 мг/кг ежедневно животным экспериментальной группы ( $n=18$ ) на 6-е сутки после оперативного вмешательства сопровождается предотвращением уменьшения периферической активности (на 39,26%), а также количества вертикальных стоек (на 22,07%) по сравнению с контрольной ( $p < 0,05$ ) группой (рис.17), что приводит к статистически значимому увеличению локомоторной активности, предотвращая изменения последней на 36,23%. Что касается изменений центральной активности, то они были статистически недостоверны.

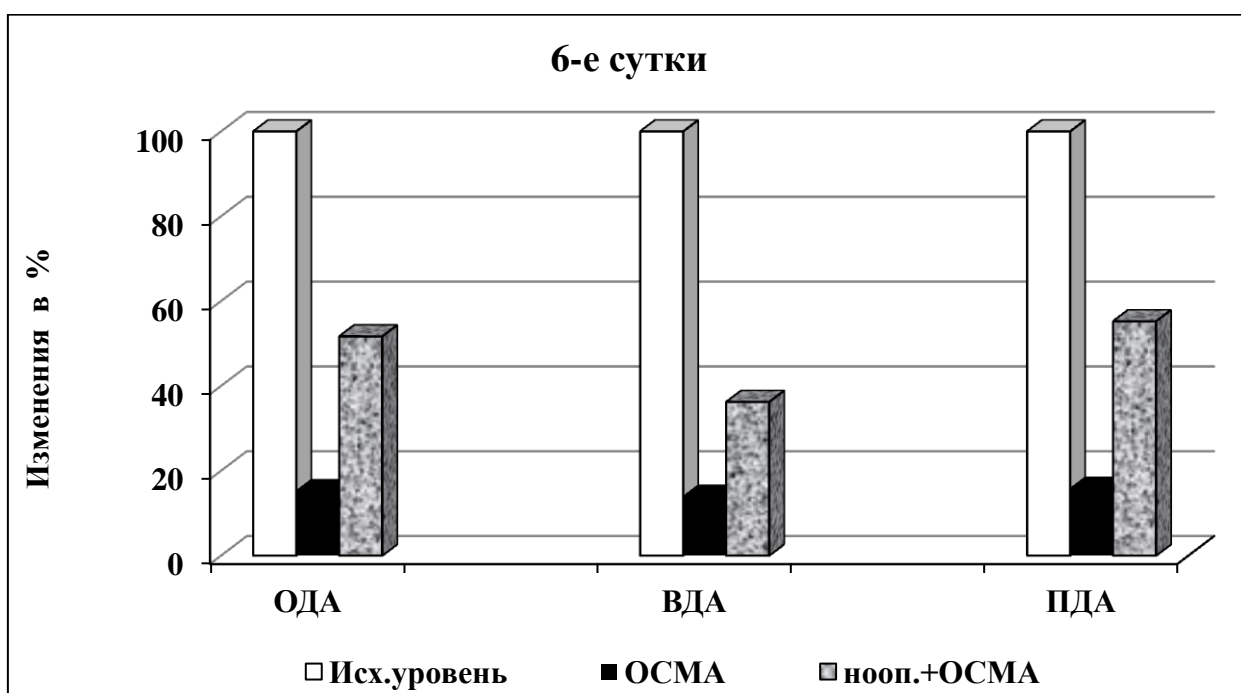


Рисунок 17. Влияние ноопепта в дозе 0,5 мг/кг на степень изменений двигательной активности крыс в тесте "открытое поле" через 6 суток после ОСМА



Аналогичные по характеру изменений сдвиги в поведении животных были зарегистрированы и на 12 сутки после ОСМА: уровень общей двигательной активности был снижен на 79,6% вследствие понижения периферической активности на 80,3% и количества вертикальных стоек на 75,95% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходным значением (рис.18). На основании полученных данных можно заключить, что нарушения локомоторной активности сохраняются и в более поздние сроки ишемии. Хотя по данным ряда авторов, сенсомоторные нарушения у крыс после ОСМА неоднозначны: одни авторы указывают на преходящий характер двигательных нарушений (2-3 недели), а другие о сохранении их на относительно длительный срок, тем не менее, полученные результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими о выраженном двигательном дефиците на ранних (до 2-х недель) сроках ишемии.

Таблица 6 (б).

*Параметры поведение крыс в "открытом поле" после ОСМА на фоне ежедневного внутрибрюшинного введения ноопепта в дозе 0,5 мг/кг, на 6-е сутки после моделирования локальной ишемии ( $M \pm \sigma_m$ ).*

Параметры открытого поля	через 12 суток после ОСМА		
	Исх. уровень (n=30)	ОСМА (n=12)	ОСМА + ноопепт (n=18)
ПА	30,23±4,68	6,0±2,43 ( $P_1^*$ )	15,9±7,35( $P_2^*$ )
ЦА	0,43±0,37	0 ( $P_1^*$ )	0,7±0,78
ВА	7,07±1,82	1,7±0,72 ( $P_1^*$ )	4,1±2,27 ( $P_2^\#$ )
ОДА	37,73±5,92	7,7±2,88 ( $P_1^*$ )	20,7±9,75 ( $P_2^*$ )
КАД	1,73±0,51	1,3±0,72	1,0±0,88
КАГ	1,37±0,53	0,3±0,42 ( $P_1^*$ )	1,9±0,90 ( $P_2^*$ )

\*-  $p < 0,05$ , #-  $p > 0,05$ ,  $P_1$  –по сравнению с базовым уровнем,  $P_2$  –по сравнению с ОСМА

Примечательно, что на фоне внутрибрюшинного введения ноопепта в течении 12-ти суток также было отмечено увеличение всех параметров двигательной активности животных (периферической, вертикальной и общей) более чем в 2,5 раза по сравнению с перевязкой (таб. 6 (б)).

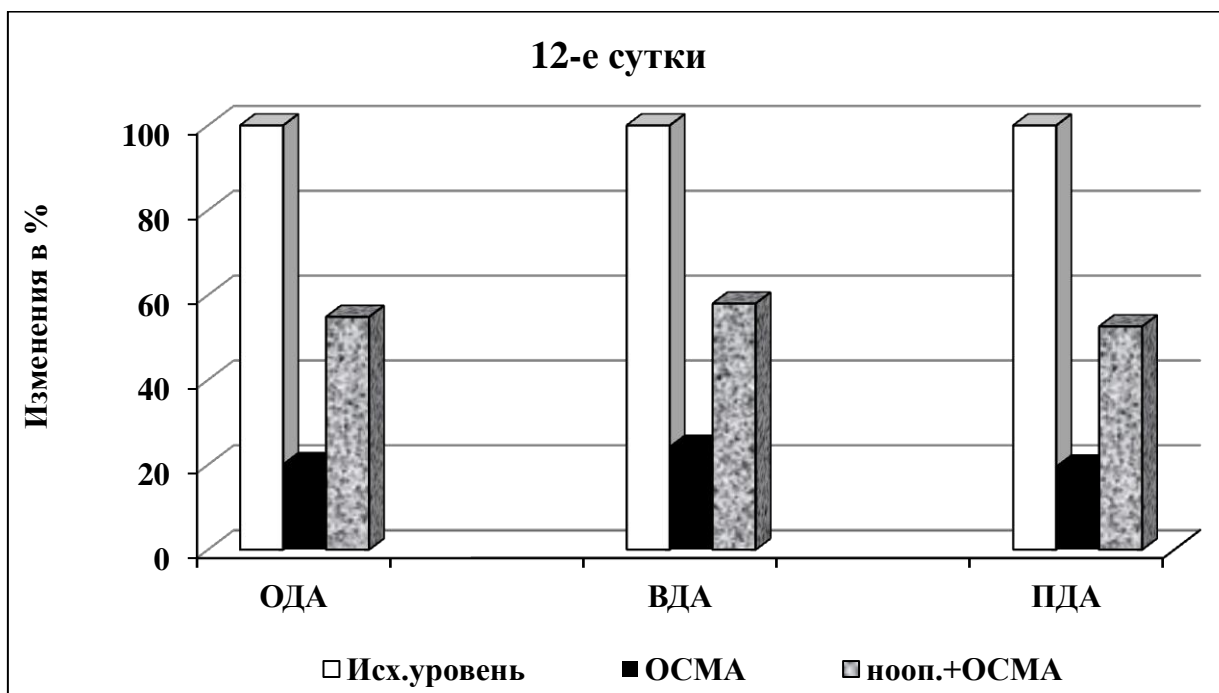
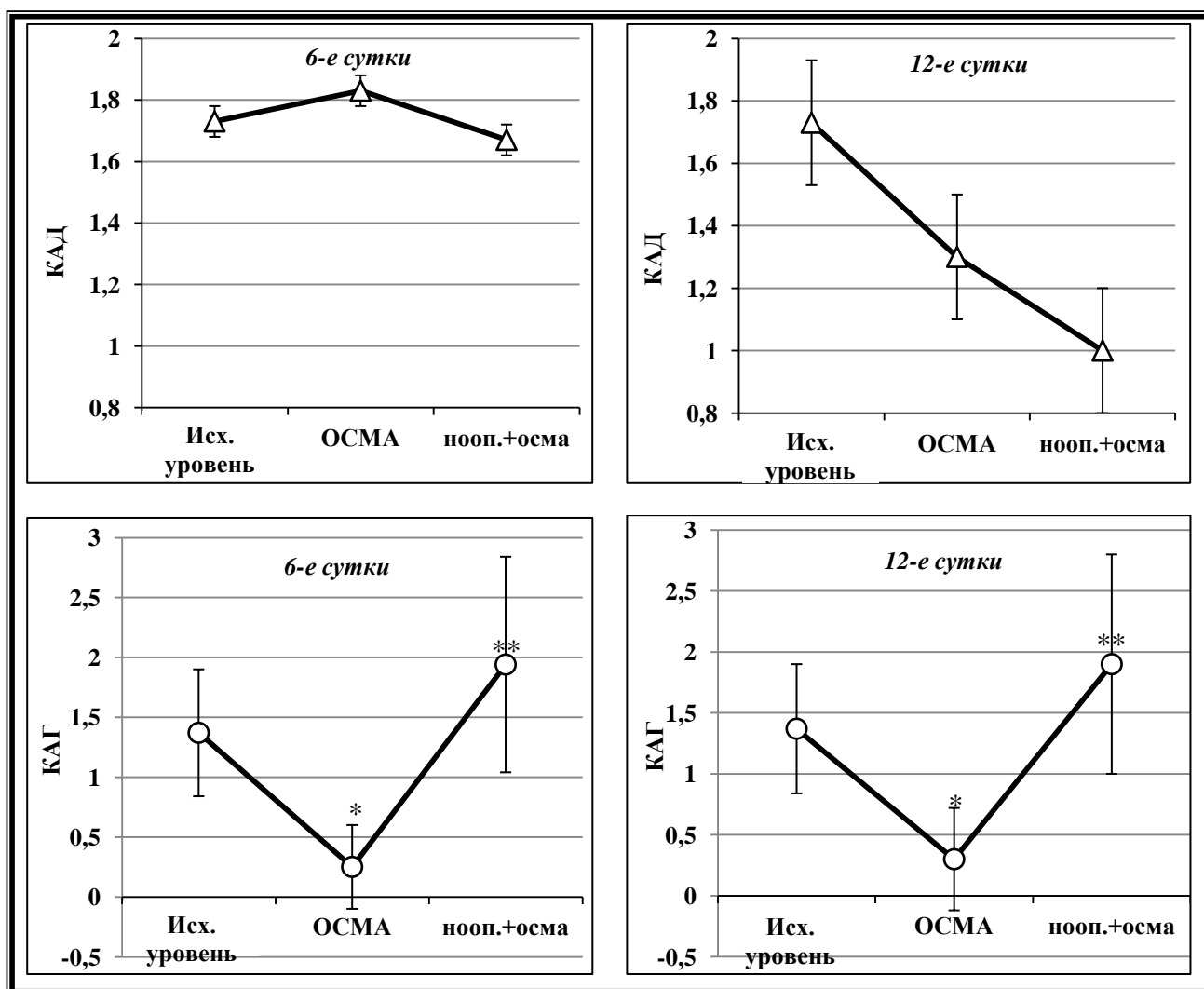


Рисунок 18. Влияние ноопепта в дозе 0,5 мг/кг на степень изменений двигательной активности крыс в тесте “открытое поле” через 12 суток после ОСМА

При детализации анализа параметров, характеризующих поведение животных в тесте ОП оказалось, что введение ноопепта сказывается на эмоциональности животных в данном тесте, однако достоверность различий сравниваемых параметров не всегда статистически значима. Так, при оценке эмоциональности до и после операции, было выявлено, что количество актов дефекации (КАД), которое, в исследуемых группах животных, изначально не было высоким, через 6 суток после ОСМА незначительно (на 5.78%) возрастало (таб. 6(а)), тем не менее, эти изменения, также как и некоторое снижение указанного параметра на более поздних сроках ишемии – на 12-е сутки, носили статистически недостоверный характер. Согласно литературным данным тревожность беспородных крыс в тесте ОП

меньше, чем у инбрендных (Мельникова А.Е., 2001), что объясняется изначально высокой устойчивостью беспородных крыс к стрессу, по сравнению с линейными. Кроме того, ряд авторов полагает, что при повторных тестированиях в ОП наблюдается некоторое уменьшение тревожности и снижение основных составляющих исследовательской активности (центральная активность), связанное с привыканием животного к предлагаемым условиям и потерей новизны (Бессалова Е.Ю., 2011). Тем не менее, наблюдаемое снижение количества актов дефекации (рис.19) на фоне введения ноопепта в дозе 0,5 мг/кг, по сравнению с контрольной группой ОСМА, носило статистически недостоверный характер, как на 6-е (9.25%), так и на 12-е сутки (17.3%) после ишемии.



\* $p < 0,05$ -по сравнению с исходным уровнем, \*\* $p < 0,05$ -по сравнению с ОСМА

*Рисунок 19. Влияние ноопепта в дозе 0,5 мг/кг в день на эмоциональность животных после ОСМА в тесте открытое поле (n=30) ( $M \pm \sigma_x$ ) на 6-е и 12-е сутки после ишемии.*

Что касается количества актов груминга (КАГ) (особенно короткого), который относится некоторыми авторами к, так называемой, категории комфортного поведения, оно достоверно снижалось (рис.19.) в указанные сроки (на 6-е и 12-е сутки) после ОСМА на 81.8% и 78.1% соответственно ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходным уровнем. Примечательно, что увеличение числа актов груминга у животных получавших ноопепт в дозе 0,5 мг/кг, как на 6-е (на 122,7%), так и на 12-е сутки (на 116,9%) день по сравнению с ишемизированными животными носило достоверный характер.

### **3.2.2. Влияние ноопепта на поведение крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта**

Одним из критериев для оценки соединений с нейропротекторной активностью является исследование их способности проявлять анксиолитическое действие, поскольку развитие тревожности является одним из характерных последствий ишемического инсульта (Courtney de V.A. et al., , 2001). Экспериментами показано, что проявления неврологических и поведенческих изменений зависят от области поражения. Так, например, Castillo и соавторы (1993) обнаружили, что сочетанное развитие тревожности с депрессией, либо отдельно только тревожность, особенно выражено проявляются при левосторонних корковых нарушениях. Действительно, экспериментами было подтверждено, что в условиях избранной модели проксимальной окклюзии средней мозговой артерии поведение животных характеризуется развитием анксиогенности в различные сроки после оперативного вмешательства (Баласанян М.Г., 2003).

Для более детальной оценки способности ноопепта устранять тревожность у крыс в условиях локально-ишемических поражений мозга, наш выбор был остановлен на широко используемой на сегодняшний день модели «приподнятого крестообразного лабиринта» (ПКЛ) (Courtney de V.A. et al., 2001). Согласно литературным данным, тест

приподнятого крестообразного лабиринта, в отличие от других моделей, - это простой метод оценки тревожности у грызунов в течение 5 минут. Он не причиняет животным физической боли, не включает использование таких нежелательных факторов как электрошок, индукция страха у животного, не требует таких ограничений для животного, как лишение пищи или воды. Иными словами он не включает такие манипуляции, которые сами по себе могут изменить ответ животного на тестируемое соединение. По-сути, тест ПКЛ позволяет выявить визуально не проявляемые, но свойственные животным психофизиологические аспекты тревожности (Баласаян М.Г., 2003). Поведение животных в ПКЛ, как и в других моделях тревожности, формируется из двух противоположных тенденций развивающихся при помещении грызунов в незнакомую обстановку: стремлении животного исследовать новое окружение и стремлении избежать опасности. Особенно выражено эта модель конфликта проявляется в открытых пространствах. Экспериментальными исследованиями показано, что в крестообразном лабиринте у крыс и мышей наблюдается естественная тенденция к избеганию открытых рукавов (Лапин И.П., 2000). Специфическим показателем, характеризующим именно тревожность в данной модели, является процент заходов и время, проведенное в открытых рукавах и центре, тогда как суммарное количество заходов в рукава является функцией как исследовательской, так и двигательной активности.

Результаты экспериментальных исследований по изучению поведенческих реакций крыс после локальной ишемии подтвердили, что окклюзия левой средней мозговой артерии сопровождается развитием тревожности, причем степень выраженности в сдвигах параметров, характеризующих поведение животного в крестообразном лабиринте, зависит от сроков перевязки. Так, согласно полученным данным, представленным в таблице 7 (а), на 6-е сутки после ишемии у животных отмечались изменения параметров поведения в ПКЛ, подтверждающие развитие анксиогенности и угнетения исследовательской активности. Причем, наблюдаемое в указанные сутки изменение, и сопровождалось достоверным уменьшением всех основных параметров, характеризующих поведение животных в ПКЛ:

времени и % заходов в ОР на 97,4% и 79,2% соответственно; общего числа заходов на 75,6% и времени проведенного в центре лабиринта на 85,2% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходным уровнем.

Дисперсионный анализ влияния ноопепта на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте после окклюзии средней мозговой артерии показал, что

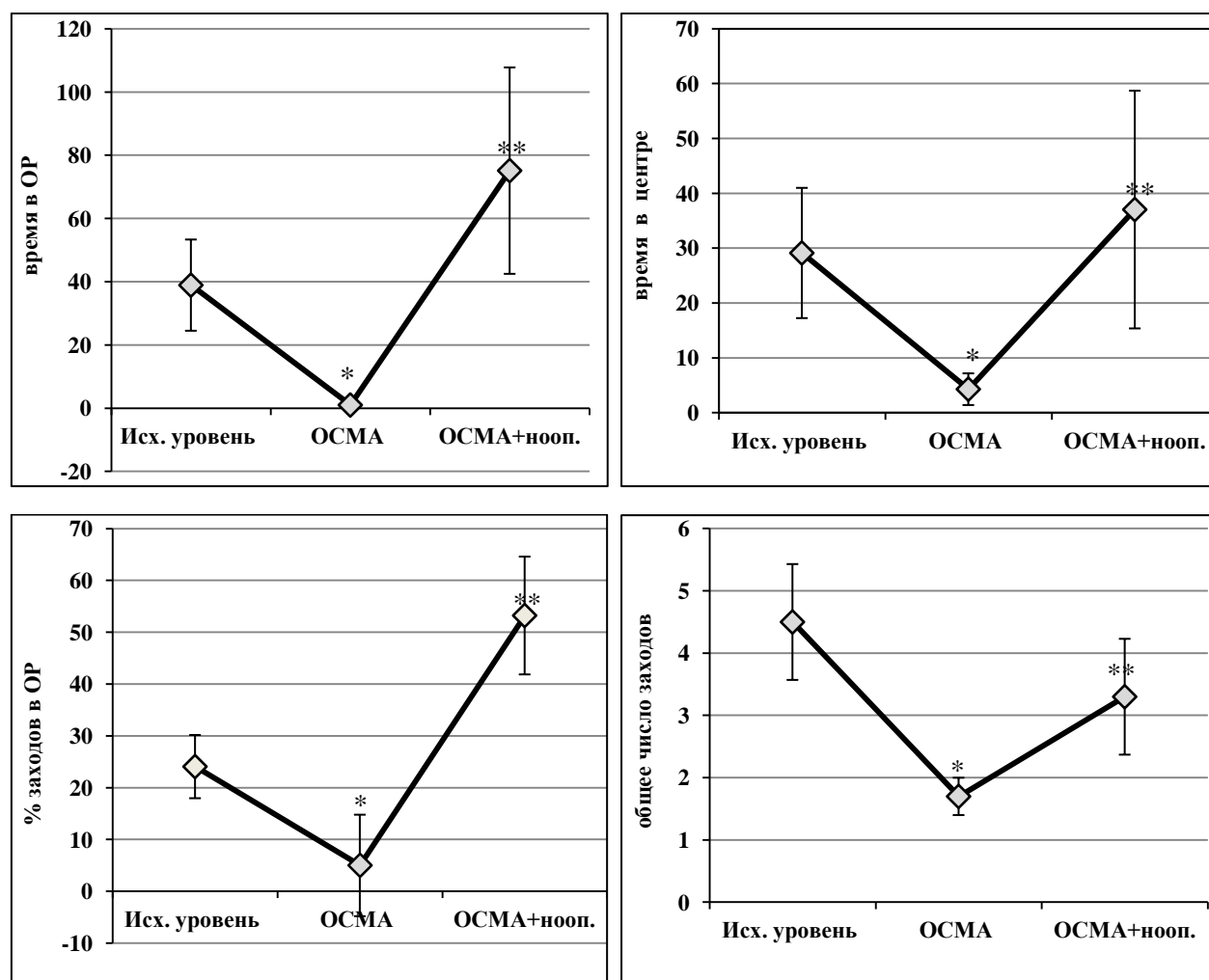
Таблица 7 (а).

*Параметры поведения крыс в тесте «приподнятого крестообразного лабиринта» через 6 суток после ОСМА и на фоне внутривенного введения ноопепта в дозе 0.5 мг/кг в день ( $M \pm \sigma_x$ ).*

Параметры ПКЛ	6-е сутки		
	Исходный уровень (n=30)	ОСМА (n=10)	ОСМА+ нооп. (n=20)
Число заходов в ОР	1,4±0,41	0,1±0,20( $P_1^*$ )	1,75±0,47( $P_2^*$ )
Время в ОР (сек)	38,93±14,43	1,00±1,96( $P_1^*$ )	75,15±32,65( $P_2^*$ )
% заходов в ОР	24,08±6,1	5,00±9,80( $P_1^*$ )	53,25±11,37( $P_2^*$ )
% времени в ОР	12,98±4,81	0,33±0,65( $P_1^*$ )	25,05±10,88( $P_2^*$ )
Число заходов в ЗР	3,10±0,57	1,00±0,00( $P_1^*$ )	1,4±0,39
Время в ЗР (сек)	231,93±20,00	294,7±3,45( $P_1^*$ )	187,8±46,24( $P_2^*$ )
Время в центре (сек)	29,13±11,87	4,30±2,89( $P_1^*$ )	37,05±21,67( $P_2^*$ )
Общее число заходов в рукава	4,50±0,93	1,1±0,20( $P_1^*$ )	3,15±0,66( $P_2^*P_1^*$ )

\*-  $p < 0.001$ ,  $P_1$  – по сравнению с исходным уровнем,  $P_2$  – по сравнению с ОСМА

шестидневное введение препарата в дозе 0,5 мг/кг в день крысам экспериментальной группы (n=20) предотвращало развитие наблюдаемых нарушений, достоверно увеличивая значения указанных параметров поведения крыс: времени и % заходов в ОР на 190,5% и 200,4% соответственно; общего числа заходов на 45,6% и времени проведенного в центре лабиринта на 112,4% ( $p < 0,05$ ) не только по сравнению с контрольной группой но и с исходным уровнем. Причем, на основании полученных можно сделать вывод, что на 6-е сутки после ОСМА ноопепта в дозе 0,5 мг/кг более выражено влияет на анксиогенность, чем на двигательную и исследовательскую активность.



\*-  $p < 0,05$  по сравнению с исходным уровнем, \*\*-  $p < 0,05$  по сравнению с ОСМА

Рис. 20. Влияние ноопепта в дозе 0,5 мг/кг на параметры поведения крыс в тесте ПКЛ на 6-е сутки после ОСМА (n=30) ( $M \pm \sigma_m$ )

В более поздние сроки ишемии картина наблюдаемых при ОСМА нарушений оказалась менее выраженной, и через 12 суток после оперативного вмешательства

статистически достоверное уменьшение наблюдалось не для всех исследуемых параметров, в частности это утверждение справедливо в отношении тех параметров, которые указывают на анксиогенность. Так, при увеличении сроков перевязки до 12-ти суток, один из таких параметров, а именно % заходов в открытые рукава практически не претерпевал изменений, а другие – время, проведенное в открытых рукавах и время в центре, хотя и снижались по сравнению с исходным уровнем (на 38,9% и 60,5% соответственно), тем не менее, эти изменения носили статистически недостоверный характер (таб. 7(б)).

Таблица 7 (б).

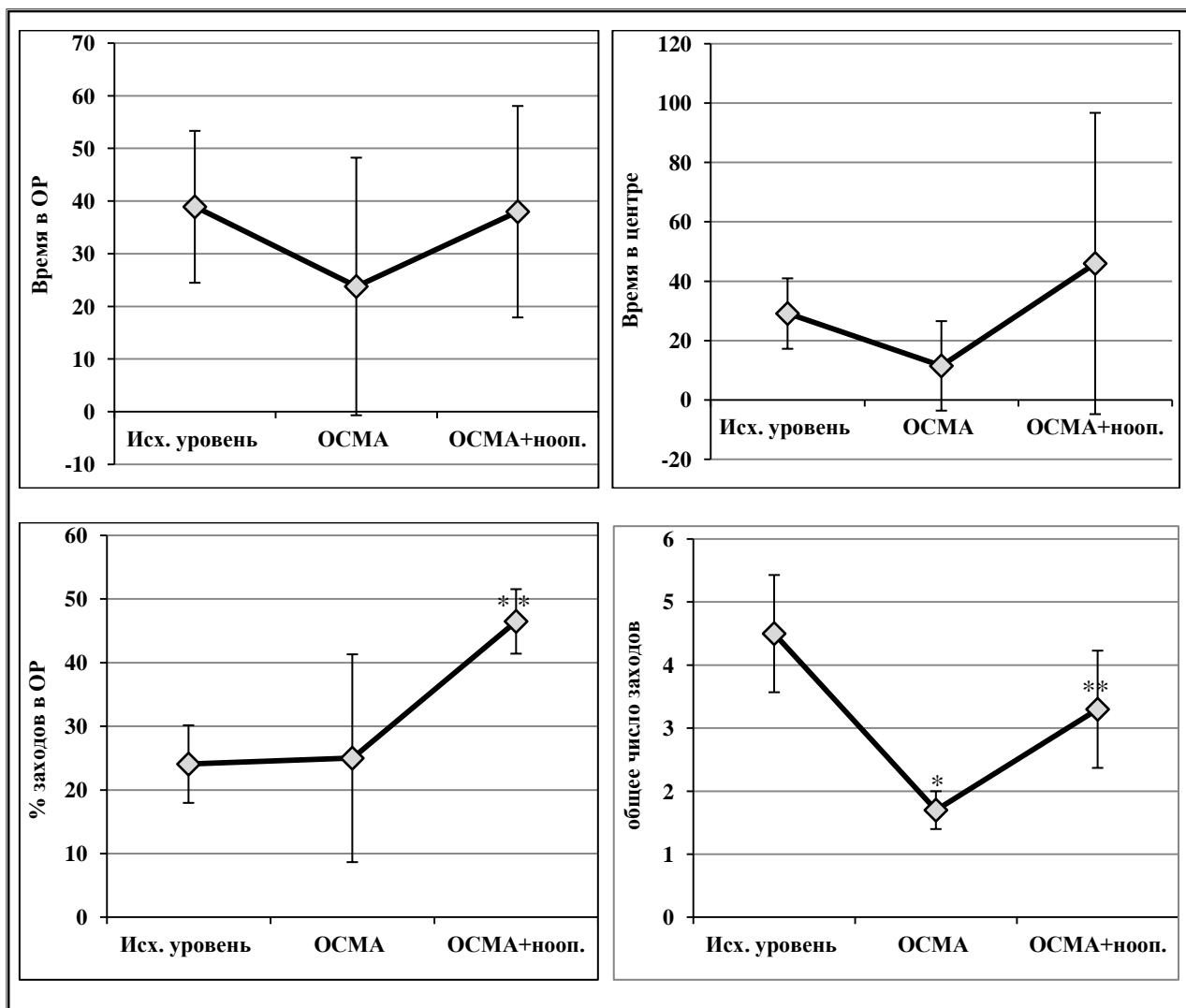
*Параметры поведения крыс в тесте «приподнятого крестообразного лабиринта» через 6 суток после ОСМА и на фоне внутрибрюшинного введения ноопепта в дозе 0.5 мг/кг в день ( $M \pm \sigma_M$ ).*

Параметры ПКЛ	Исходный уровень (n=30)	12-е сутки	
		ОСМА (n=10)	ОСМА+ нооп. (n=10)
Число заходов в ОР	1,4±0,41	0,50±0,33(P <sub>1</sub> *)	1,5±0,44(P <sub>2</sub> *)
Время в ОР (сек)	38,93±14,43	23,8±24,47	38,00±20,09
% заходов в ОР	24,08±6,1	25,00±16,33	46,50±5,07(P <sub>1,2</sub> *)
% времени в ОР	12,98±4,81	7,93±8,16	12,67±6,7
Число заходов в ЗР	3,10±0,57	1,2±0,26(P <sub>1</sub> *)	1,8±0,57(P <sub>1</sub> *)
Время в ЗР (сек)	231,93±20,00	264,70±32,05	215,0±53,04
Время в центре (сек)	29,13±11,87	11,50±15,08	46,00±50,77
Общее число заходов в рукава	4,50±0,93	1,7±0,30(P <sub>1</sub> *)	3,3±0,93 (P <sub>2</sub> *)

\*-  $p < 0.001$ , P<sub>1</sub> – по сравнению с исходным уровнем, P<sub>2</sub> – по сравнению с ОСМА



Таким образом, поведение, описываемое указанными параметрами, оказалось нечувствительным к действию ишемии на данном сроке. Что касается параметров характеризующих исследовательскую и двигательную активность, то на 12-е сутки уменьшение общего числа заходов в рукава лабиринта не только составляло 62,2% по сравнению с исходным уровнем ( $p < 0,05$ ), но и оказалось статистически значимым на данном сроке ишемии (рис.20).



\*-  $p < 0,05$  по сравнению с исходным уровнем, \*\*-  $p < 0,05$  по сравнению с ОСМА

Рис. 21. Влияние ноопепта в дозе 0,5 мг/кг на параметры поведения крыс в тесте ПКЛ на 12-е сутки после ОСМА ( $n=30$ ) ( $M \pm \sigma_x$ )

Ежедневное введение ноопепта в дозе 0,5 мг/кг продолжительностью до 12 суток характеризовалось достоверным увеличением общего числа заходов и % заходов в ОР на 35,5% и 190,1% соответственно ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Обращает на

себя внимание то факт, что изменения таких важных показателей как время в открытых рукавах и центре лабиринта, хотя и оказались недостоверными по сравнению с окклюзией, однако их значения почти достигали исходного уровня (рис. 21).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что развитие тревожности на фоне ОСМА наиболее выражено на 6-е сутки ишемии, хотя угнетение исследовательской активности сохраняется на более поздних сроках после окклюзии СМА. Анализ выявленного ранее анксиолитического эффекта ноопепта в условиях локальной ишемии, свидетельствует о том, что препарат довольно эффективно предотвращает развитие тревожности, вызванное перевязкой средней мозговой артерии. При этом, сравнение эффектов препарата при использовании его с различной продолжительностью показало, что на фоне перевязки средней мозговой артерии анксиолитическое действие соединения наблюдается в тот срок ишемии, при котором изменения параметров характеризующих тревожность наиболее выражены.

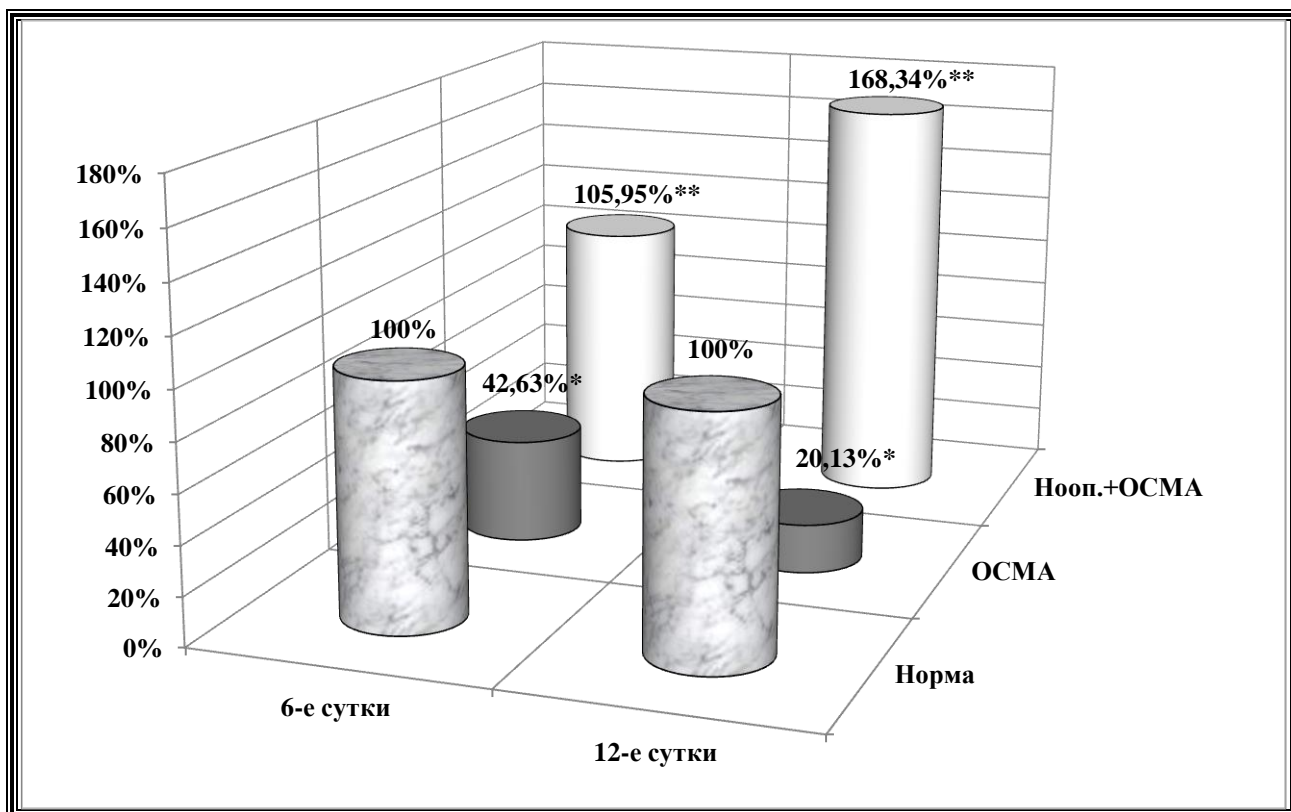
### **3.2.3. Влияния ноопепта на нарушения координации движений, вызванные локальной ишемией.**

Для оценки нарушений моторной функции после окклюзии левой средней мозговой артерии, помимо исследования двигательной активности крыс в “открытом поле”, была изучена также и моторная координация животных в тесте “вращающийся стержень”. Координация крыс оценивалась по их способности удерживаться на стержне, и количественно выражалась латентным временем (в секундах) до падения животного.

Как отмечают многие исследователи (Borlongan C. et al., , 1995), координационные нарушения у грызунов после перманентной односторонней окклюзии СМА, в отличие от показателей общей двигательной активности в ОП, не только сохраняются в течение длительного периода времени (от 1-ого до 3-х месяцев), но и имеют тенденцию к углублению.

Как показали результаты проведенных исследований, ОСМА у крыс приводит к нарушению моторной функции на исследуемых сроках после ишемии. Так, на 6-е сутки

наблюдается достоверное уменьшение латентного времени удерживания (ЛВУ) животных (n=9) на стержне на  $57,4 \pm 12,7\%$  ( $p < 0,05$ ). На 12-е сутки после ОСМА, наблюдаемые изменения были более выраженными, и составили  $79,87 \pm 14,46\%$  (рис. 22).



\*- $p < 0,05$  по сравнению с нормой, \*\* - $p < 0,05$  по сравнению с ОСМА.

Рисунок 22. Влияние ноопепта при внутрибрюшинном введении в дозе 0,5 мг/кг в день на координацию крыс (n=23) с ОСМА, в тесте “вращающегося стержня” через 6 и 12 суток после моделирования ишемии.

Особого внимания заслуживает также тот факт, что ишемические нарушения сопровождались не только изменениями латентного времени удерживания животных на стержне, но и смещением процентного соотношения животных с различными показателями ЛВУ (таб. 8 (а) и (б)) во все исследуемые сроки после моделирования ишемии. Так, на 6-е сутки после ОСМА, количество особей удерживающихся на стержне более 90 секунд уменьшалось вдвое, более того, не было крыс с показателями выше 120 секунд. А на 12-е

сутки латентное время удерживания у всех исследуемых животных было ниже отметки 90 секунд.

Таблица 8 (а).

Соотношение животных с различными показателями латентного времени удерживания на стержне, в контрольной (n=9) группе на 6-е и 12 сутки после ОСМА, в процентах.

Время (сек)	Исходный уровень	ОСМА	
		6-е сутки	12-е сутки
<b>T &lt; 90 сек</b>	77,8%	88,9%	100,00%
<b>90 &lt; T &lt; 120 сек</b>	0,00	11,11%	0,00
<b>120 &lt; T &lt; 180 сек</b>	22,2%	0,00	0,00
<b>T &gt; 180 сек</b>	0,00	0,00	0,00

Ежедневное, внутрибрюшинное введение ноопепта в дозе 0,5 мг/кг животным экспериментальной группы (n=14) привело к положительным сдвигам показателей моторной функции. Так на 6-е сутки после ОСМА среднее значение латентного времени удерживания было в пределах нормы (до 105,95%) по сравнению с показателями до операции и наблюдалось достоверное отличие от аналогичных показателей в контрольной группе животных, не получавших ноопепт после ОСМА (рис. 22).

На 12-е сутки показатели значительно превосходили в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) не только значения контрольной группы, но и нормы, хотя в последнем случае отличие не было статистически значимым, поскольку увеличение латентного времени удерживания по сравнению с исходным значением наблюдалось не у всех животных в группе.

Особого внимания заслуживает тот факт после введения ноопепта в течении 6-ти дней после ОСМА, количество животных (21,4% от общего количества) удерживающихся на стержне более 180 с значительно превосходило число животных (7,1% от общего количества) со временем удерживания более 90 с. На 12-е сутки после приема препарата, более 50% крыс удерживались на стержне более 90 секунд, а количество особей с латентным

временем удерживания более 180 секунд увеличивалось втрое по сравнению с исходным уровнем (таб. 8 (б)).

Таблица 8 (б).

*Соотношение животных с различными показателями латентного времени удерживания на стержне, в экспериментальной (n=14) группе на 6-е и 12 сутки после ОСМА, в процентах.*

Время (сек)	Исходный уровень	ОСМА	
		6-е сутки	12-е сутки
<b>T &lt; 90 сек</b>	50,00%	71,4%	42,9%
<b>90 &lt; T &lt; 120 сек</b>	14,30%	7,1%	14,3%
<b>120 &lt; T &lt; 180 сек</b>	21,4%	0,00	0,00
<b>T &gt; 180 сек</b>	14,30%	21,4%	42,9%

Обобщая полученные данные можно заключить, что ноопепт улучшает моторную координацию животных на вращающемся стержне во все исследуемые сроки после локально-ишемических повреждений мозга.

#### **3.2.4. Антиамнестический эффект ноопепта при ОСМА.**

Исследования последних десятилетий сформулировали основные подходы к экспериментальному изучению средств для фармакологической коррекции постишемических нарушений. Суть их сводится к тому, что помимо изучения влияния препаратов на базовые аспекты заболевания (мозговой кровотока, метаболизм и нейропатологические процессы), необходимо также определение способности нейропротекторов влиять на клинические проявления последствий ишемии, такие как нарушения когнитивных функций ЦНС, в первую очередь, память и способность к обучению, поскольку известно, что инсульт сопровождается не только прямым повреждением нервной ткани, но и вторичными

изменениями, являющимися следствием отдаленных нейрохимических и метаболических процессов.

Наиболее простым, информативным и широко применяемым методом для оценки когнитивных функций (особенно ассоциативного обучения и различных видов памяти) в моделях экспериментальной ишемии у грызунов является выработка условного рефлекса пассивного избегания (Буреш Я. и Бурешова О., 1991), основанная на реакции перехода, по методике разработанной Ярвиком и Коппом и модифицированной для крыс Кингом и Глассером. Методика основана на естественном предпочтении грызунами более темных участков пространства. В процессе обучения животное наказывается за совершение инстинктивного действия - перехода в темную камеру с ярко освещенной платформы. Показателем формирования памяти является латентное время до повторения указанного действия при следующем тестировании (Vucsafulco J. J., 2000). Преимуществом данного метода, помимо простоты проведения, быстроты обучения и воспроизводимости результатов, является то, что в зависимости от последовательности манипуляций: обучение, повторное тестирование и моделирование патологии, а также от методики проведения, можно изучать действие фармакологически активных веществ на различные когнитивные функции: процессы обучения, приобретения навыков, консолидации памяти, сохранение памятного следа и т.д. Более того, многими экспериментальными исследованиями подтверждено, что в отличие от методов активного избегания, при которых нарушения двигательной функции могут влиять на результат экспериментов, в методике УРПИ нарушения локомоторной активности после моделирования ишемии, в частности гемипарез, не оказывают существенного влияния на способность животных заходить в темный отсек, тем самым не искажают конечный результат (Hirakawa M. et al., , 1998).

При исследовании влияния ноопепта на сохранность памятного условно-рефлекторного следа методом УРПИ было установлено, что препарат обладает способностью предотвращать нарушения памяти, вызванные перевязкой левой средней мозговой артерии.

В данной серии опытов у крыс (n=28) предварительно вырабатывали условный рефлекс пассивного избегания, проверку которого осуществляли через 24 ч. Латентное время захода до обучения составляло  $17,86 \pm 8,16$  с. Рефлекс считался выработанным, если животное

после обучения в течении 180 с не заходило в темную камеру, и оставалось на освещенной платформе. Животные с меньшими показателями исключались из эксперимента. Сохранение памятного следа проверяли на 6-е и 12-е сутки после ОСМА, измеряя латентное время, проведенное на открытой платформе до захода в темный отсек.

Как и в последующих экспериментах, после перевязки СМА животные были произвольно разделены на группы: экспериментальную (n=16), получавшую ноопепт в дозе 0,5 мг/кг и контрольную (n=12) получавшую 0,9% раствор хлорида натрия в эквивалентном объеме.

Как показали полученные данные, в группе животных с ОСМА на 6-е сутки после ишемического повреждения наблюдалось достоверное уменьшение латентного времени захода в темную камеру, которое составило  $103,42 \pm 46,08$  с ( $p < 0,05$ ). К 12-ым суткам регистрируемые изменения стали более выраженными, латентный период захода уменьшился до значения  $69,30 \pm 42,37$  с ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о нарушении сохранности памятного следа с увеличением сроков перевязки. Полученные результаты подтверждаются литературными данными, согласно которым ишемические повреждения коры головного мозга приводит к ощутимым нарушениям сохранения памяти, что выражается в существенном снижении латентного периода в тесте УРПИ (Романова Г. и Шакова Ф., 2006; Hirakawa M. et al., , 1998; Borlongan C. Et al., , 1995).

Примечательно, что помимо уменьшения указанного параметра, процентное соотношение животных с латентным временем менее 180 с, также изменялось в зависимости от сроков ишемии (рис. 23). На 12-е сутки после перевязки подавляющее большинство крыс (83.3%) заходили в темный отсек.

Статистический анализ экспериментальных данных показал, что у животных группы ежедневно получавшей ноопепт в дозе 0,5 мг/кг после оперативного вмешательства под воздействием препарата наблюдалось достоверное увеличение латентного времени захода в темную камеру по сравнению с контрольной группой, как на 6-е, так и на 12 сутки после перевязки (рис. 24). Значения латентного времени перехода составили соответственно  $164,44 \pm 19,41$  с и  $167,5 \pm 24,5$  с.

### 6-е сутки после ишемии

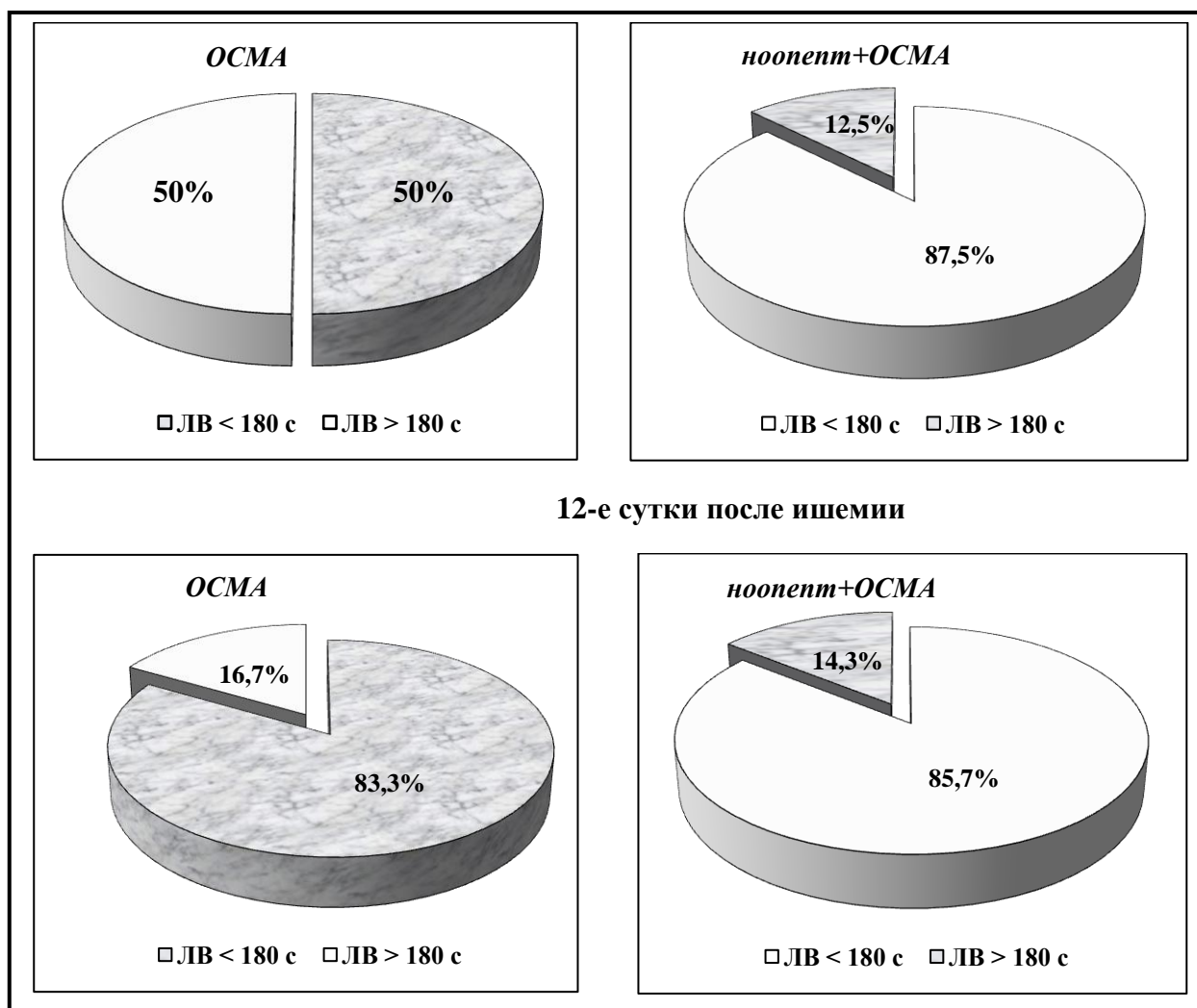


Рисунок 23. Влияние ноопепта в дозе 0,5 мг/кг в день на процентное соотношение крыс с различными показателя латентного времени захода, после перевязки левой средней мозговой артерии на 6-е и 12-е сутки ишемии

Следует также отметить, что в группе животных получавших ноопепт изменение латентного времени, проведенного на открытой платформе до захода в темный отсек, не имели статистически значимых по сравнению с показателями после обучения до перевязки. По-существу, препарат почти полностью предотвращает нарушения памяти вызванные ОСМА.



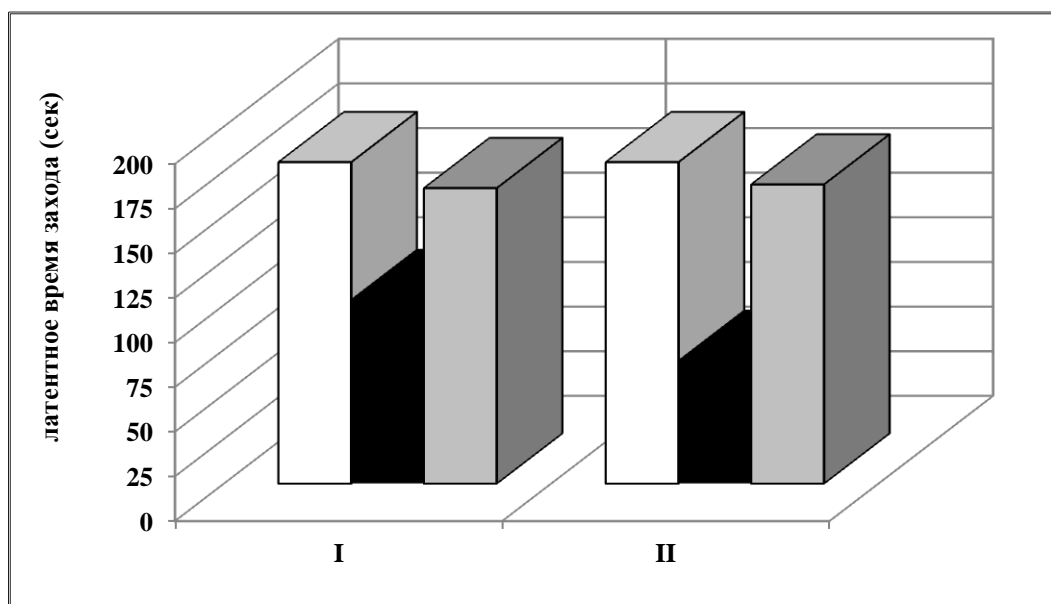


Рисунок 24. Влияние ноопепта в дозе 0,5 мг/кг на УРПИ у крыс на 6-е и 12 сутки после ишемии.

I-6-е сутки после ОСМА,

II-12 сутки после ОСМА;

□ - латентное время после обучения,

■ - латентное время в контрольной группе после ОСМА,

▒ – латентное время в группе получавшей препарат после ОСМА

Особого внимания заслуживает тот факт, что после применения препарата процентное соотношение крыс с латентным временем захода более и менее 180 с также значительно отличались от соответствующих значений в группе крыс, не получавших препарат (рис. 23). Как оказалось, под действием ноопепта, подавляющее большинство животных (87,5% и 85,7% соответственно) не заходило в темный отсек как на 6-е, так и на 12-е сутки после ишемии, что свидетельствует о сохранении у них памятного следа.

Представленные данные говорят о способности ноопепта предотвращать нарушения памяти вызванные ОСМА.

\*\*\*

Таким образом, экспериментальные данные, полученные при исследовании влияния ноопепта на память и поведение животных показали, что после перманентной окклюзии левой

средней мозговой артерии у крыс наблюдаются заметное угнетение двигательной и исследовательской активности на всех исследуемых сроках ишемии, а также имеет место нарушение сохранности памятного следа и развитие тревожности, причем если в первом случае степень выраженности в сдвигах указанных параметров, возрастает с увеличением срока перевязки, то анксиогенность наиболее выражена на ранних сроках после оперативного вмешательства. Результаты исследований говорят о том, что ноопепт обладает способностью предотвращать нарушения памяти и локомоторной активности после ОСМА, что сохраняется даже при увеличении сроков перевязки.

Обобщая, можно заключить, что ноопепт обладает способностью устранять психоневрологические последствия локально-ишемических нарушений мозга, в модели ОСМА.

### **3.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПОФУСЦИНА В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНО-ИШЕМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ МОЗГА ПОД ВЛИЯНИЕМ НООПЕПТА**

Важным критерием для оценки нейропротекторов является их способность предотвращать развитие оксидативного стресса. В последние годы все больше внимания уделяется изучению одного из его маркеров, конечного продукта перекисного окисления липидов – липофусцина. В связи с этим, в следующей серии экспериментов была исследована способность ноопепта влиять на количественные сдвиги в его содержании на фоне локальной ишемии вызванной перевязкой средней мозговой артерии в головном мозге крыс, в различные сроки после оперативного вмешательства.

Исследование влияния ноопепта на изменение содержания липофусцина в головном мозге крыс на фоне левосторонней окклюзии средней мозговой артерии показали, что дипептид обладает способностью предотвращать избыточное (по сравнению с интактными животными) накопление пигмента, наблюдаемое после оперативного вмешательства (таб. 9).

Липофусцин – “пигмент старения”, накапливается с возрастом в лизосомах постмитотических клеток (Anderton В.Н., 1997, Zielinski S. and Pörtner H., 2000). Он является смесью различных веществ белковой и липидной природы (30-70% и 20-50% соответственно), также содержит небольшое количество углеводов (до 7%) и следы металлов, в особенности железа (Terman A. and Brunk U., 2006). Примечательно то, что несмотря на различную этиологию, механизмы формирования лизосомальных пигментов и их состав практически одинаковы как при старении, так и при различных нейродегенеративных заболеваниях (Giaccone G. et al, 2011; Georgakopoulou E.A. et al., 2013). Согласно результатам многочисленных исследований, накопление липофусцина является функцией старения, окислительного стресса и недостаточности систем антиоксидантной защиты (Perše M. et al., 2013). Возрастные изменения наиболее заметны в постмитотических клетках, таких как нейроны и кардиомиоциты (Brunk U.T. and Terman A., 2002), поскольку в пролиферативных клетках, окислительно-индуцированные повреждения с возрастом не накапливаются постоянно, очевидно благодаря процессу деления клетки, существенно разбавляющему поврежденные структуры. Таким образом, постмитотические клетки аккумулируют биологический мусор, поскольку они не обновляются благодаря процессу деления.

Наличие липофусцина в нейрональных клетках впервые было описано Ханновером в 1840 г. Вначале он рассматривался в качестве пигмента старения, однако многочисленными исследованиями *in vitro* подтверждено, что он сам может являться повреждающим фактором (Fonseca D.B. et al., 2005; Kiselyov K. et al., 2007). В частности, он может приводить к нарушению аутофагоцитоза клеточных компонентов, а также может увеличивать чувствительность лизосом к оксидативному стрессу и видимому свету, приводить к деструкции лизосом и инициировать апоптоз. Так, например, окислительный стресс сверх нормы может привести к разрыву лизосом благодаря внутрилизосомальным, катализируемым железом реакциям перекисного окисления. Если в лизосому поступает большое количество перекиси водорода, то образование гидроксильных радикалов (или железосодержащих феррильного или перферрильного радикалов) может быть достаточно для нарушения стабильности лизосомальной мембраны и способно инициировать высвобождение лизосомальных литических ферментов в цитозоль. Показано, что умеренное высвобождение лизосомальных ферментов может инициировать апоптоз различными путями, тогда как более значительное высвобождение указанных ферментов приводит к клеточной смерти по типу некроза. Таким образом, клетки, накопившие большое количество липофусцина более чувствительны к окислительно-индуцированному повреждению благодаря увеличенным лизосомам и наличию в них пигмента липофусцина содержащего железо. Экспериментальными исследованиями доказана прямая корреляция между интенсивностью накопления нейролипофусцина и уровнем смертности у различных лабораторных животных (Ding L. et al., 2010). В условиях ишемических нарушений мозга, когда спровоцирован сложный каскад метаболических реакций, усугубляющий повреждение нервной ткани, с одной стороны инициируется патологическое накопление липофусцина – маркера оксидативного стресса, в нервной ткани, с другой стороны, его избыточное количество само по себе провоцирует дальнейшее повреждение нейрональных структур.

Так, при оценке количественных изменений содержания липофусцина в головном мозге на фоне локальной ишемии, вызванной проксимальной перевязкой левой средней мозговой артерии, у молодых половозрелых крыс было выявлено, что после оперативного вмешательства имело место достоверное увеличение содержания пигмента как в поврежденном, так и интактном

полушариях головного мозга животных на исследуемых сроках после моделирования локальной ишемии (рис. 25).

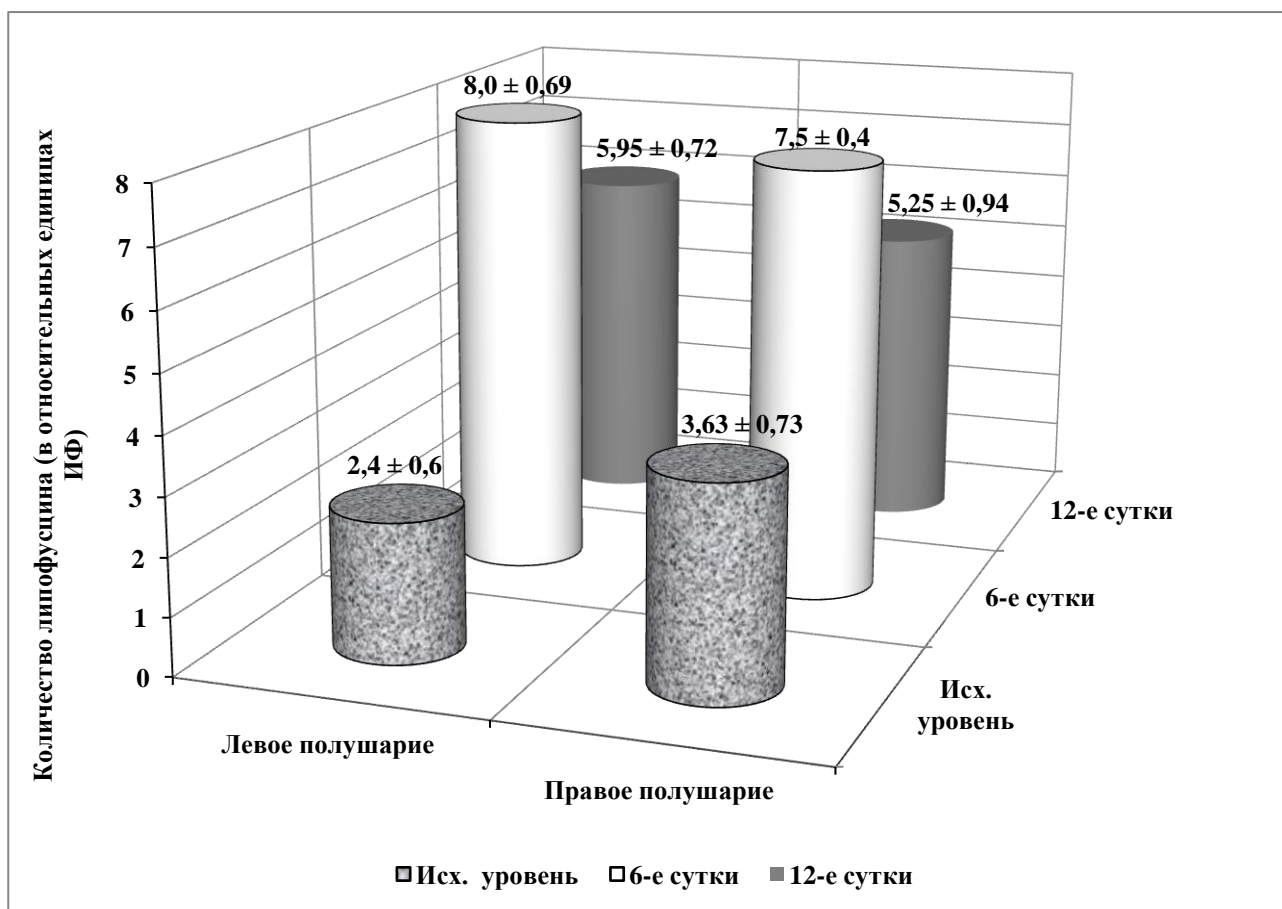


Рисунок 25. Количественные изменения содержания липофусцина (в относительных единицах интенсивности флюоресценции) в левом и правом полушариях головного мозга крыс на 6-е и 12-е сутки после ОСМА.

Следует отметить, что содержание липофусцина между левым и правым полушариями у здоровых животных изначально не было одинаковым. Статистический анализ данных показал, что содержание пигмента старения в левом и правом полушариях у не оперированных животных достоверно отличается в 1,51 раза ( $p < 0,05$ ) (таб. 9), составляя  $2,40 \pm 0,60$  единиц интенсивности флюоресценции (ИФ) и  $3,82 \pm 0,52$  ИФ соответственно, что, по всей вероятности, связано с феноменом функциональной межполушарной асимметрии (ФМА), которая выражается в сохранении во всех возрастных периодах электрофизиологического и концентрационного

градиента различных компонентов между доминантным и субдоминантным полушариями мозга (Клименко Л.Л., 2008).

Ишемия, вызванная перевязкой левой средней мозговой артерии, приводила к статистически значимому существенному увеличению количества липофусцина как в ипсилатеральном ( $8,00 \pm 0,69$  ИФ), так и контралатеральном ( $7,50 \pm 0,40$  ИФ) полушариях мозга на 6-е сутки после ОСМА. При этом разница в содержании пигмента между полушариями в этом случае была недостоверна. Таким образом, количество липофусцина в неповрежденном полушарии увеличилось в 2.1 (от значения  $3,82 \pm 0,52$  до  $7,50 \pm 0,40$  ИФ), а в поврежденном, в 3.3 раза (от  $2,40 \pm 0,60$  до значения  $8,00 \pm 0,69$  ИФ) ( $p < 0,05$ ).

Аналогичные, но менее выраженные изменения наблюдались и на 12-е сутки после ишемического повреждения: в левом от  $2,40 \pm 0,60$  до значения  $5,95 \pm 0,82$ , в правом от  $3,82 \pm 0,52$  до  $5,25 \pm 0,94$  ИФ. При этом, обращает на себя внимание тот факт, что в поврежденном полушарии, также как и на 6-е сутки ишемии, увеличение исследуемого параметра было намного заметнее, чем в контралатеральном, с изначально большим содержанием липофусцина, вследствие чего и на этом сроке концентрации пигмента в правом и левом полушариях отличались статистически недостоверно.

Увеличение содержания липофусцина как в ипсилатеральном, так и контралатеральном полушариях, с одной стороны, подтверждает характерную для организма тенденцию к восстановлению исходной функциональной межполушарной асимметрии (Клименко Л.Л., 2008), с другой стороны – говорит в пользу того, что даже односторонние нарушения микроциркуляции головного мозга могут инициировать патологические изменения в контралатеральном, неповрежденном полушарии.

Полученные результаты согласуются с описанными ранее в литературе данными многих исследований на животных (мыши, крысы, собаки и т.д.), согласно которым накопление липофусцина в различных структурах ЦНС наблюдается в условиях глобальной ишемии головного мозга. При этом исследователи также отмечают, что липофусцин по существу может являться гистохимическим маркером повреждения нейронов в ЦНС (ChanYin-Ch. et al., 2006).

Таблица 9.

Количественные сдвиги содержания липофусцина в полушариях головного мозга половозрелых крыс (n=24) на фоне введения ноопепта в дозе 0.5мг/кг в день при ОСМА, выраженные в относительных единицах интенсивности флюоресценции (M±SD)

Экспериментальные группы	Левое полушарие	Достоверность отличий	Правое полушарие	Достоверность отличий	Коэффициент асимметрии
<b>Интактные животные</b> (n=8)	2,40±0,6,0	P <sub>1</sub> *	3,63±0,73	P <sub>1</sub> *	1,53±0,16*
<b>ОСМА</b> 6-е сутки (n=8)	8,00±0,69	P <sub>2</sub> *	7,50±0,40	P <sub>1</sub> <sup>#</sup> , P <sub>2</sub> **	0,94±0,11 <sup>#</sup>
<b>ОСМА</b> 12-е сутки (n=8)	5,95±0,82	P <sub>2</sub> *	5,25±0,94	P <sub>1</sub> <sup>#</sup> , P <sub>2</sub> *	0,91±0,26 <sup>#</sup>
<b>ОСМА + ноопепт</b> 6-е сутки (n=8)	4,50±1,03	P <sub>2</sub> *, P <sub>3</sub> *	4,33±0,68	P <sub>1</sub> <sup>#</sup> , P <sub>2</sub> <sup>#</sup> , P <sub>3</sub> **	0,98±0,17 <sup>#</sup>
<b>ОСМА + ноопепт</b> 12-е сутки (n=8)	3,38±1,09	P <sub>2</sub> <sup>#</sup> , P <sub>3</sub> *	3,25±0,49	P <sub>1</sub> <sup>#</sup> , P <sub>2</sub> <sup>#</sup> , P <sub>3</sub> *	1,03±0,33 <sup>#</sup>

\*- достоверность отличий p<0,05

P<sub>1</sub> – между левым и правым полушарием

# -отличия статистически недостоверны

P<sub>2</sub> – по сравнению со значением аналогичного полушария в интактной группе

P<sub>3</sub>- по сравнению со значением аналогичного полушария в группе ОСМА

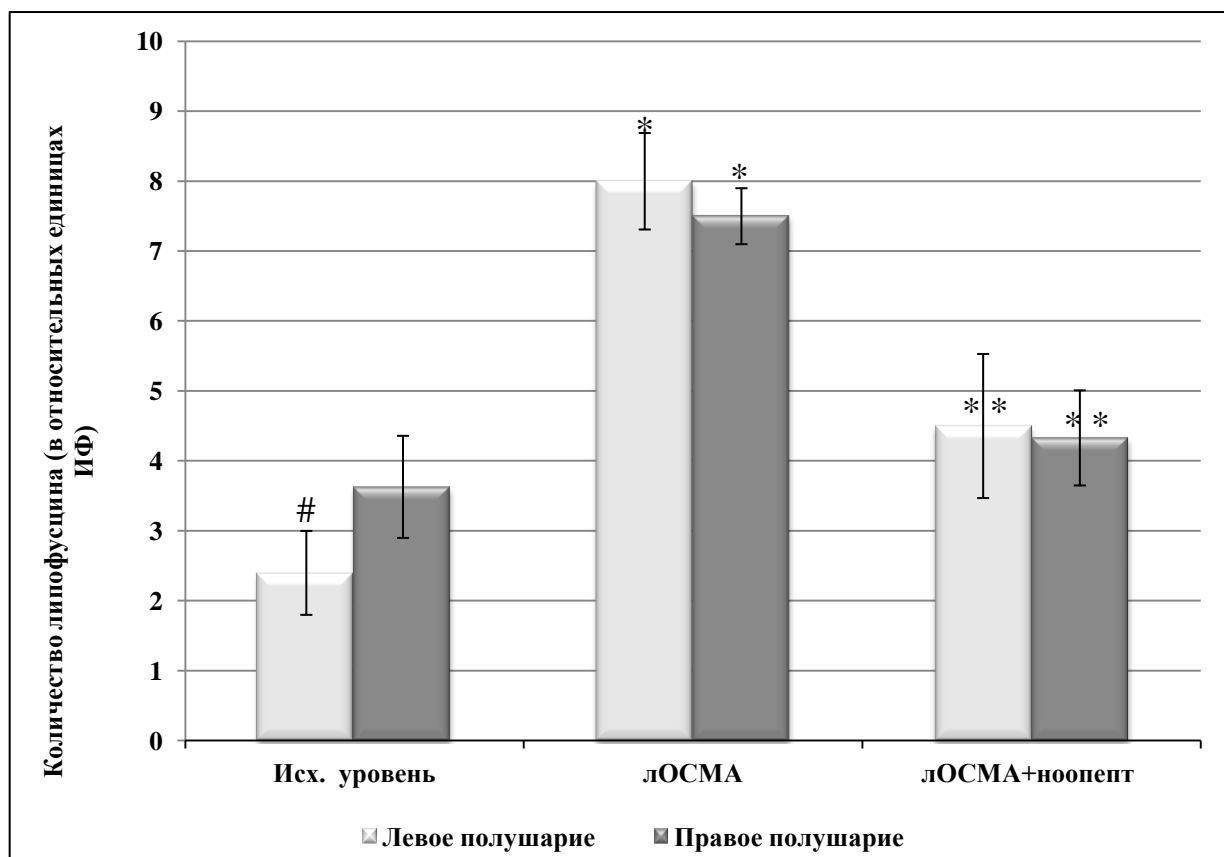
Обращает на себя внимание тот факт, что при анализе полученных нами экспериментальных данных было выявлено, что избыточное накопление липофусцина в нервной ткани коррелирует с характерными нарушениями памяти и поведения, описанными в предыдущей главе. Подобная корреляция, подтверждающая связь между накоплением липофусцина в нейронах и ухудшением процессов памяти у взрослых крыс, описана и в других экспериментальных исследованиях. При этом, вне зависимости от причин возникновения избыточного количества пигмента – естественное старение или повреждения, вызванные различными воздействиями, во всех случаях наблюдается прямая зависимость степени когнитивной и локомоторной недостаточности от уровня накопления липофусцина (Kohjimoto V. et al., 1988). Более того, есть данные о том, что антиоксиданты (витамин Е, флавоноиды, кофеин и т.д.) играют важную роль в предотвращении возрастных изменений, приводящих к повреждению мозга (Menken Z.B. et al., 1986). Так, например, многими исследованиями подтверждено, что они приводят к положительным сдвигам при дефиците обучения и памяти в тестах активного и пассивного избегания (Chan Yin-Ch. et al., 2006). Fukui и соавт. в 2002г показали, что добавление в рацион молодых животных витамина Е до стрессогенного воздействия существенно улучшает их способность к обучению и предотвращает дефицит памяти в условиях стресса. Экспериментальными исследованиями на лабораторных мышах показано, что при повреждающих воздействиях (инициированных введением D-галактозы) стимулирующих активность супероксид дисмутазы, наблюдается корреляция между нарушениями памяти, обучения, локомоторной активности и уровнем липофусцина в нервной ткани (Xiao-Hong XU and Zhao Tie-Qiao, 2002). При применении препаратов способствующих повышению антиоксидантной защиты тканей (puerarin), также наблюдается заметное улучшение когнитивных функций и двигательной активности.

Особого внимания также заслуживает тот факт, что пирацетам – первый представитель класса ноотропных препаратов, также обладает способностью предотвращать избыточное накопление липофусцина в мозге крыс, индуцированное ишемией, возникающей на фоне введения токсических доз алкоголя в течение длительного времени.

Учитывая тот факт, что ранее в экспериментах была показана антиоксидантная активность ноопепта, выражавшаяся в способности снижать повреждение нейронов в культуре клеток вызванное кислородно-глюкозной депривацией, глутаматной токсичностью и оксидативным



стрессом (Андреева Н.А. и соавт., 2000) и предупреждать повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов при иммобилизационном



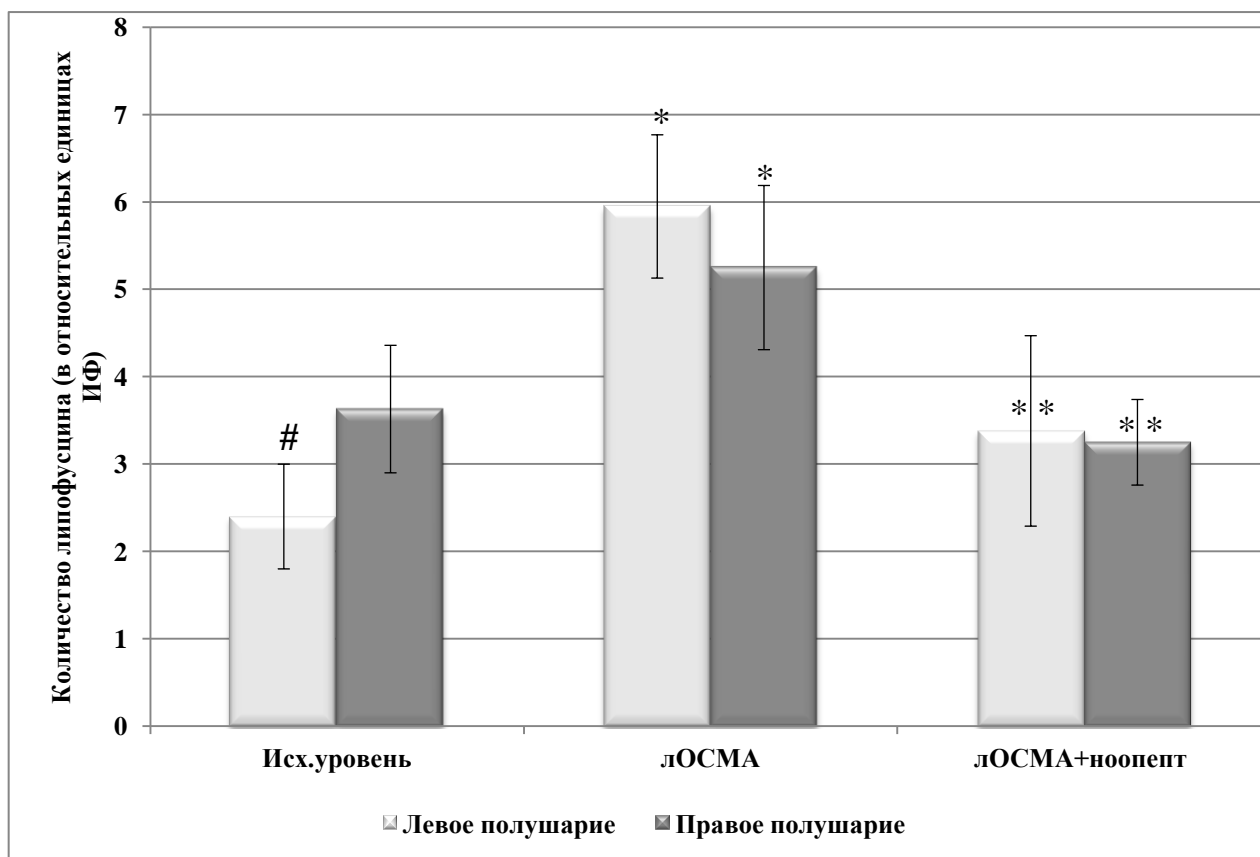
\*-  $p < 0,05$  по сравнению с исходным уровнем, \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с ОСМА, # -  $p < 0,05$  между полушариями

Рисунок 26. Количественные сдвиги в содержании липофуцина в левом и правом полушариях головного мозга крыс ( $n=8$ ) на 6-е сутки после ЛОСМА на фоне в/б введения ноопепта в дозе 0,5 мг/кг.

стрессе и высоком уровне тревожности (Лысенко А.В. и соавт., 1997; Островская Р.У. и соавт., 2003), следующая серия экспериментов была посвящена исследованию влияния препарата на количественные сдвиги липофуцина на фоне локально-ишемических повреждений мозга, вызванных окклюзией средней мозговой артерии.

Как показали результаты проведенных исследований, внутрибрюшинное введение ноопепта в условиях ОСМА на 6-е сутки, привело к статистически значимому уменьшению

содержания исследуемого пигмента как в поврежденном, так и в интактном полушариях, по сравнению с таковыми у животных, не получавших препарат (рис. 26).



\*-  $p < 0,05$  по сравнению с исходным уровнем, \*\*-  $p < 0,05$  по сравнению с ОСМА, #-  $p < 0,05$  между полушариями

Рисунок 27. Количественные сдвиги в содержании липофусцина в левом и правом полушариях головного мозга крыс ( $n=8$ ) на 12-е сутки после лОСМА на фоне в/б введения ноопепта в дозе 0,5 мг/кг.

Содержание липофусцина в ипсилатеральном полушарии составило  $4,50 \pm 1,03$ , а в контралатеральном и  $4,33 \pm 0,68$ , что, соответственно, в 1,8 и 1,7 раз ( $p < 0,05$ ) ниже показателей в группе животных, не получавших ноопепт.

Что касается более отдаленных сроков ишемии, то на двенадцатые сутки способность ноопепта предотвращать накопление пигмента была более выраженной. Отмечалось снижение количества липофусцина до значений  $3,38 \pm 1,09$  в левом и  $3,25 \pm 0,49$  в правом полушариях (рис.

27), что меньше значений в контрольной группе, не получавшей препарат в 2,4 и 2,3 раза соответственно ( $p < 0,05$ ).

Необходимо отметить, что, несмотря на положительные сдвиги в количественном содержании пигмента в исследуемые сроки ишемии, функциональная межполушарная асимметрия так и не достигла своего исходного значения (таб. 9).

Примечательно, что выраженность нарушений нейроповеденческих характеристик животных на данном сроке ишемии также существенно уменьшалась под действием аналогичных доз препарата в указанные сроки ишемии. Иными словами, в наших экспериментах также подтверждена зависимость между накоплением липофусцина в мозговой ткани и нарушениями памяти и поведения, вызванными локально-ишемическими нарушениями мозга.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что одним из возможных механизмов, способствующих проявлению нейропротекторного эффекта ноопепта в условиях локальной ишемии, может явиться его способность предотвращать накопление избыточного количества липофусцина в мозговой ткани.

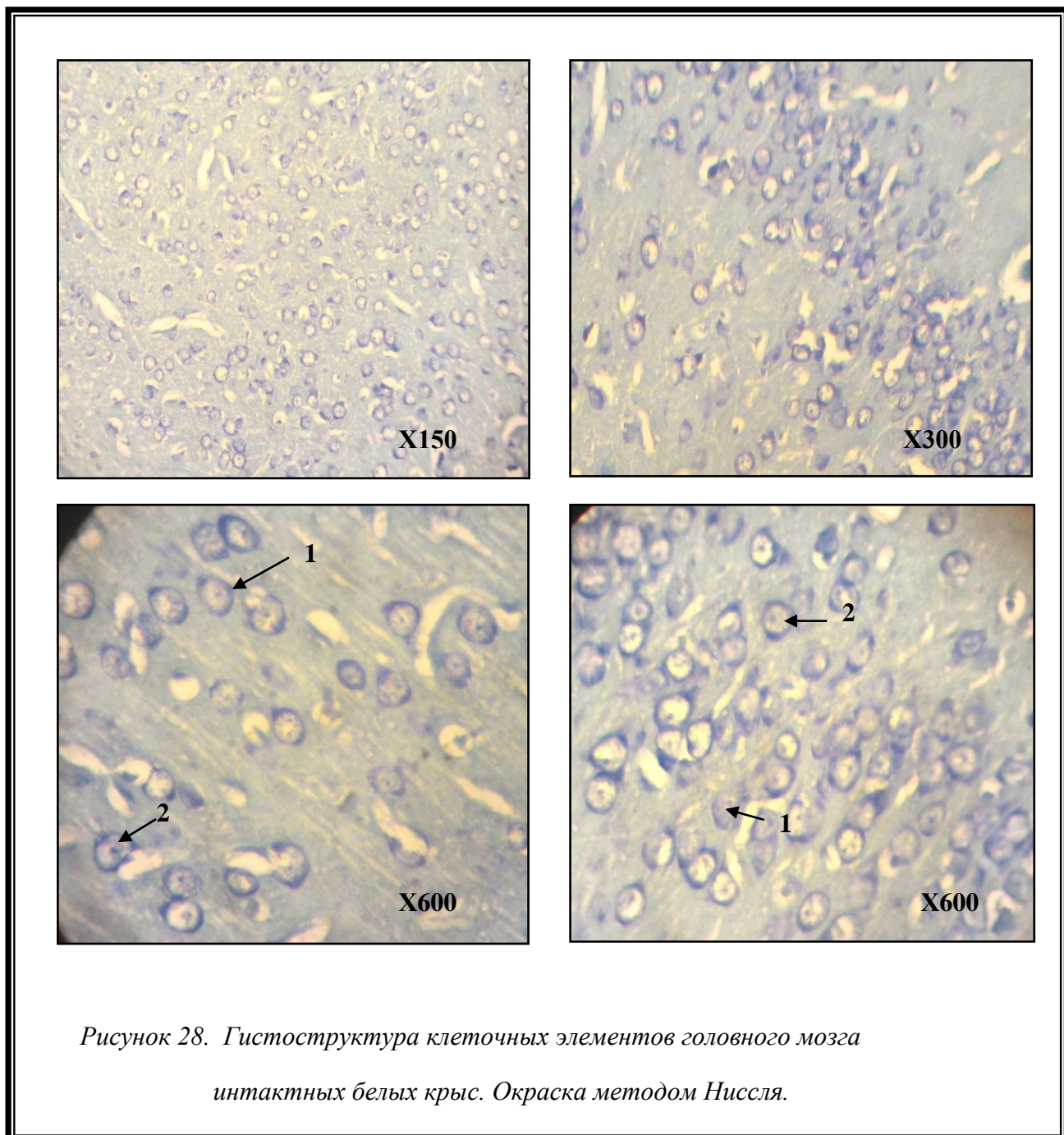
#### **3.4. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НООПЕПТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ ЛОКАЛЬНО ИШЕМИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ МОЗГА.**

При исследовании влияния ноопепта на динамику морфологических изменений головного мозга крыс при односторонней перевязке средней мозговой артерии, было установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение препарата в дозе 0,5 мг/кг после окклюзии средней мозговой артерии приводит к некоторому снижению выраженности морфологических изменений, возникающих на фоне локально ишемических нарушений, причем степень наблюдаемых изменений зависит от сроков перевязки.

Так, например, исследование морфологических сдвигов после ОСМА у крыс контрольной группы, получавших 0,9% раствор (n=5) хлорида натрия в течение 6 суток после оперативного вмешательства, показало, что в гистологических срезах различных областей головного мозга ипсилатерального полушария наблюдались патологические изменения, в частности, выявлялась картина очагового лизиса тигроидного вещества, как в коре головного мозга, так и в гиппокампе и надкорковых структурах (рис. 29(а)). Нейроциты коры в большинстве случаев были набухшими, а тигроидное вещество в основном не выявлялось. Местами наблюдались скопления глиоцитов, отмечались процессы лизирования ядер, что свидетельствуют о гибели нейронов в этих условиях. Картина выраженных морфологических изменений на фоне ОСМА становилась более отчетливой при сравнении указанных микропрепаратов со срезами мозга животных интактной группы (n=5), где клеточные элементы выявлялись почти в неизменном виде. Здесь отчетливо наблюдались контуры клеточной и ядерной поверхности, субстанция была хроматофильна (рис. 28). Встречались астроциты с крупными светлыми ядрами и мелкими ядрышками. Олигодендроциты и эндотелиоциты были гиперхромны, хорошо были видны округлые и вытянутые ядра. Однако наряду с этим в гистоструктуре интактной мозговой ткани в исследуемой области встречались также единичные пикноморфные и тeneвидные нейроны.

Почти аналогичная картина патологических изменений регистрировалась и в контрольной группе животных (n=5) на 12-е сутки после ОСМА (рис. 29 (б)). В этом случае также наблюдались процессы тотального тигролиза нейроцитов в ткани головного мозга

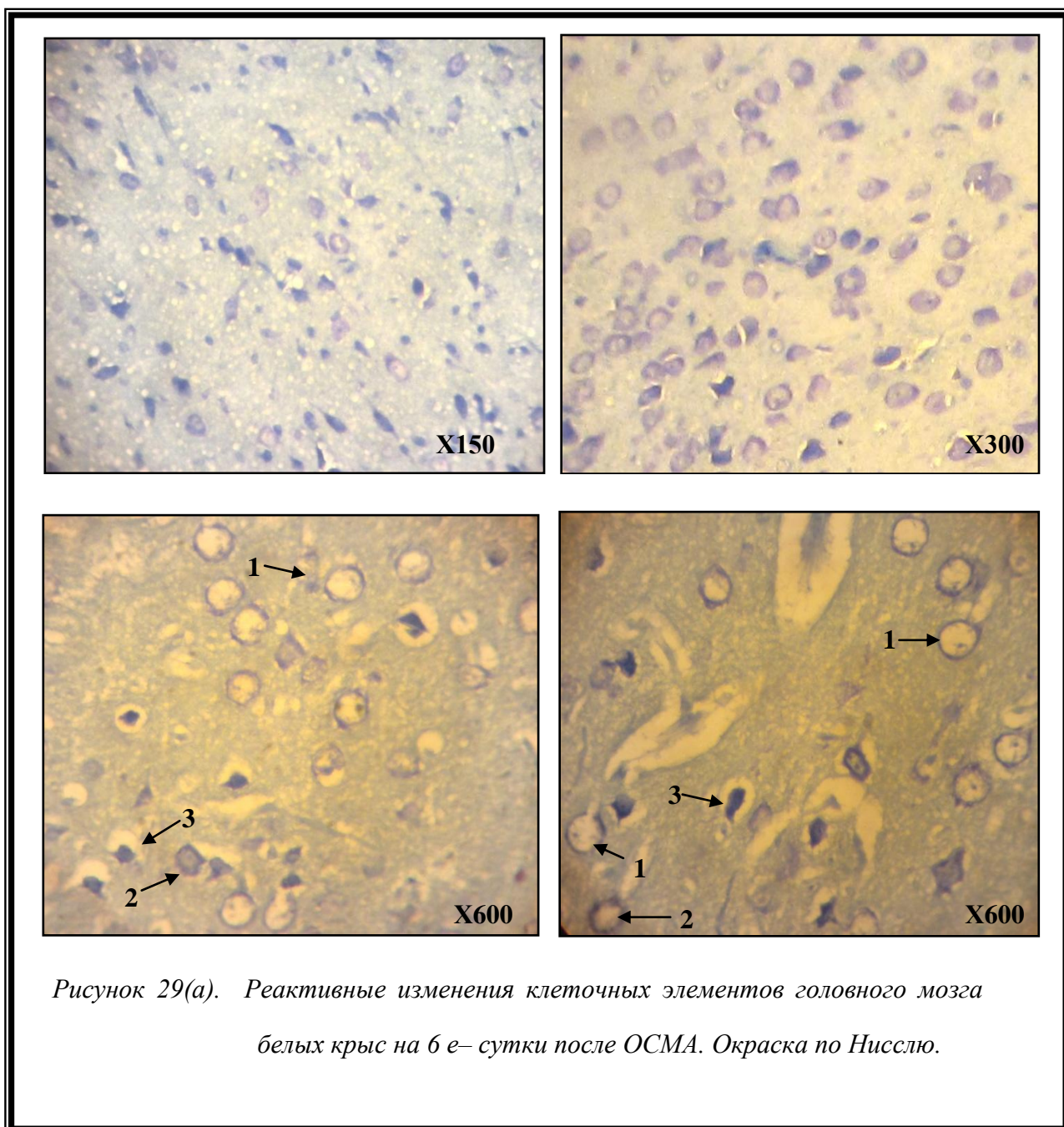
крыс. Часть нервных клеток находилась в состоянии кариоцитолита с образованием клеток – теней. Наблюдались набухшие и склонные к гибели или пикнозу клетки. В разных областях исследуемой ткани данной группы животных были видны явления резко выраженной вакуолизации.



1- тигроидное вещество

2-ядрышки

Следует также отметить, что в мозговой ткани морфологически выявлялись единичные очаги, где были хорошо сохранено хроматофильное тигроидное вещество (рис. 23).

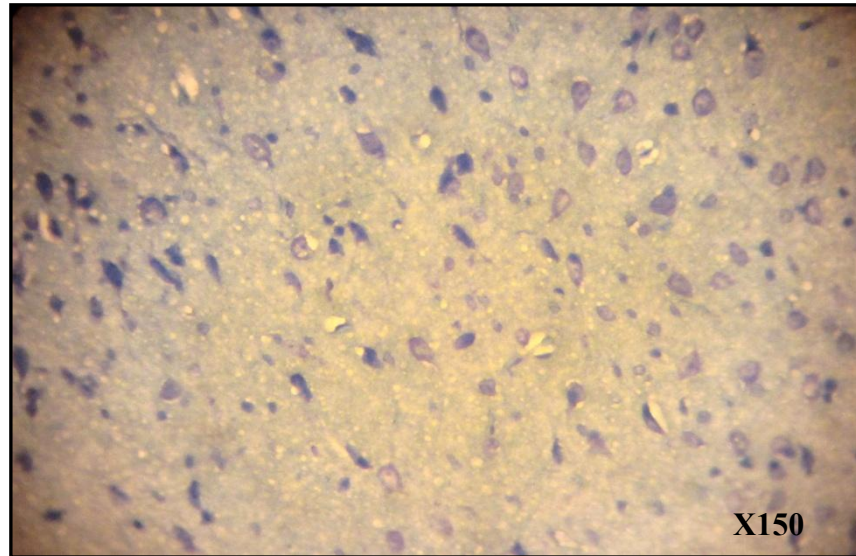


1-вакуолизация

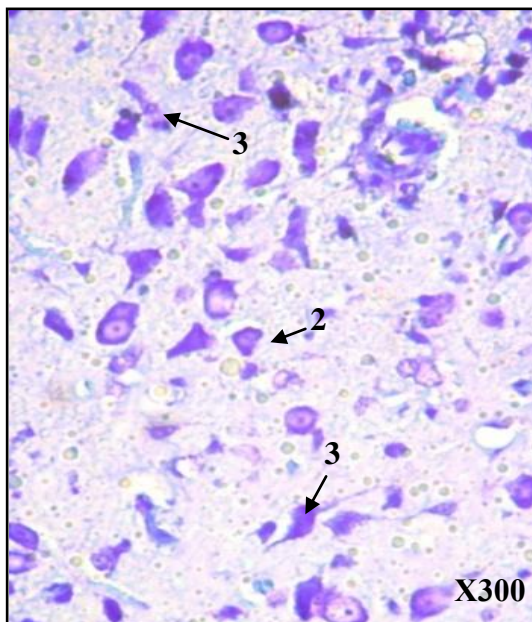
2-тигролиз

3-клетки тени

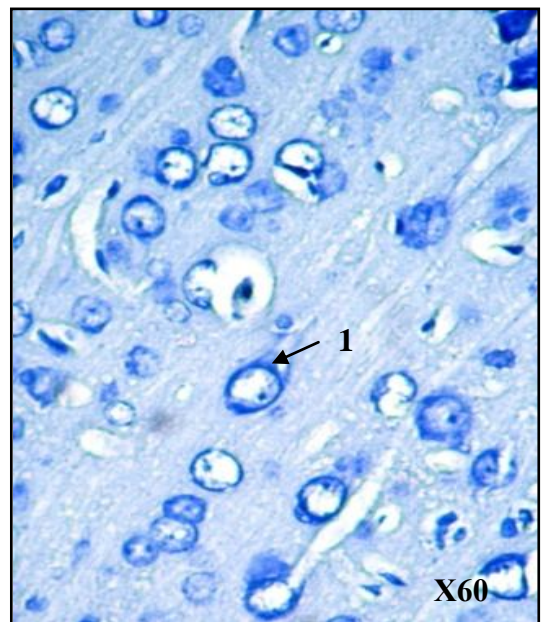
На основании полученных данных можно утверждать, что перманентная окклюзия СМА



X150



X300



X60

*Рисунок 29(б). - Реактивные изменения клеточных элементов головного мозга у белых крыс через 12 суток после ОСМА. Окраска по Нислю,*

*1-вакуолизация*

*2-тигролиз*

*3-клетки тени*

действительно приводит к необратимым очаговым изменениям в нервной ткани, затрагивающим как кору головного мозга, так и подкорковые структуры, а степень выраженности указанных изменений возрастает с увеличением сроков перевязки.

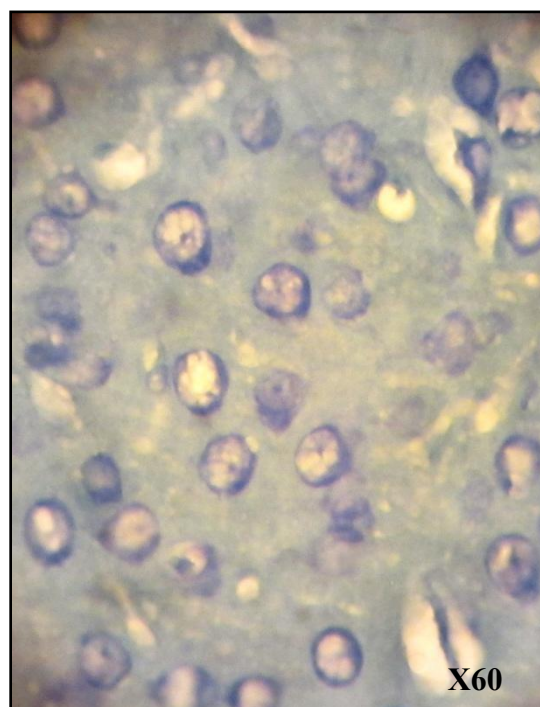
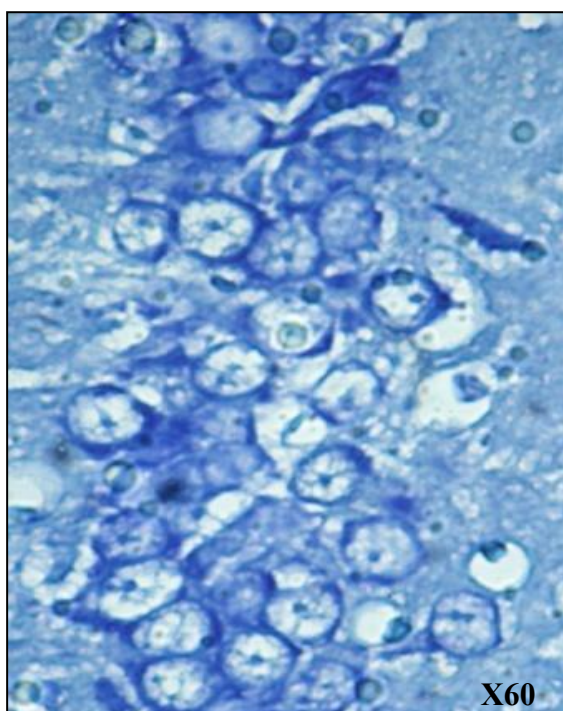
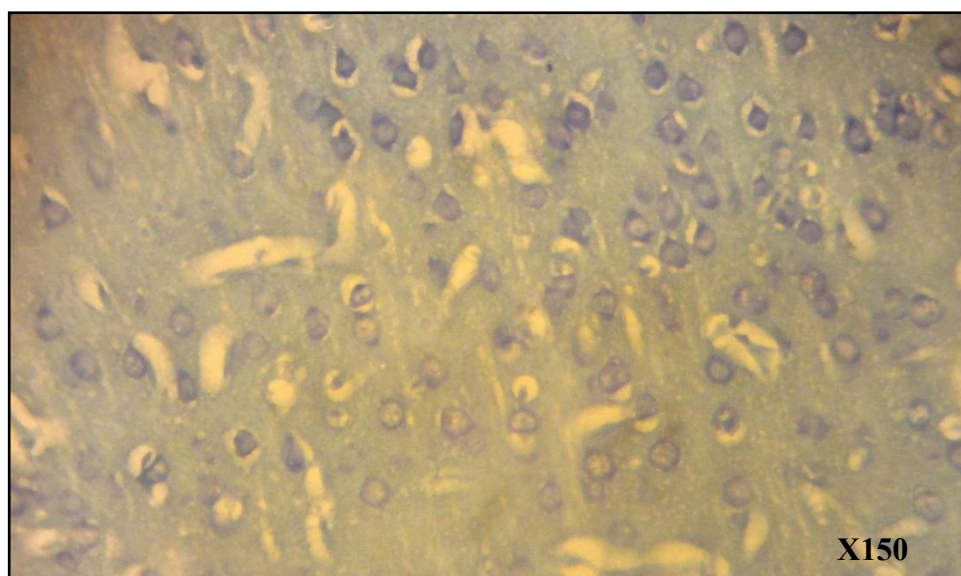
В экспериментальной группе животных (n=5), ежедневно получавших ноопепт в дозе 0,5 мг/кг на 6-е сутки после окклюзии средней мозговой артерии отмечалось некоторое изменение гистоструктуры мозговой ткани исследуемой области головного мозга в сравнении со срезами контрольной группы животных, не получавших препарат в аналогичные сроки. Так, морфологически отмечалась тенденции к восстановлению тигроидного вещества в цитоплазме нейронов, как в коре, так и в гиппокампе и подкорковых структурах (рис. 30(a)). В некоторых исследуемых областях четко выявлялись жизнеспособные нейроны. Однако на некоторых участках мозговой ткани, там не менее, регистрировались явления лизиса тигроидного вещества.

Почти аналогичная, но чуть менее выраженная картина положительных морфологических сдвигов наблюдалась и в группе животных (n=5), получавших ноопепт в течение 12 суток после ОСМА. Так, в срезах этой группы нейроны с распадом тигроидного вещества выявлялись в сравнительно меньшем количестве, чем в срезах контрольной группы в аналогичные сроки после перевязки, но, тем не менее, положительные сдвиги качественно уступали показателям предыдущей экспериментальной группы (6-е сутки после ОСМА). В гистологических срезах этой группы также отмечались некоторые признаки восстановления гистоструктуры исследуемой области мозговой ткани, где наблюдалось сравнительно хорошее окрашивание тигроидного вещества (рис. 30 (б)). Ядра нейронов были более светлыми, чем в срезах группы не получавшей ноопепт. Однако отмечались также некоторые морфологические нарушения в виде вакуолизации, кариолизиса, и выявлялись участки, лишенные нервных клеток.

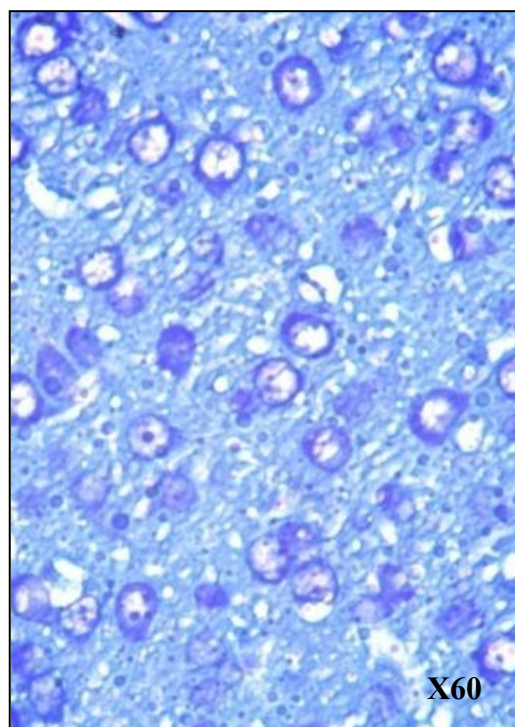
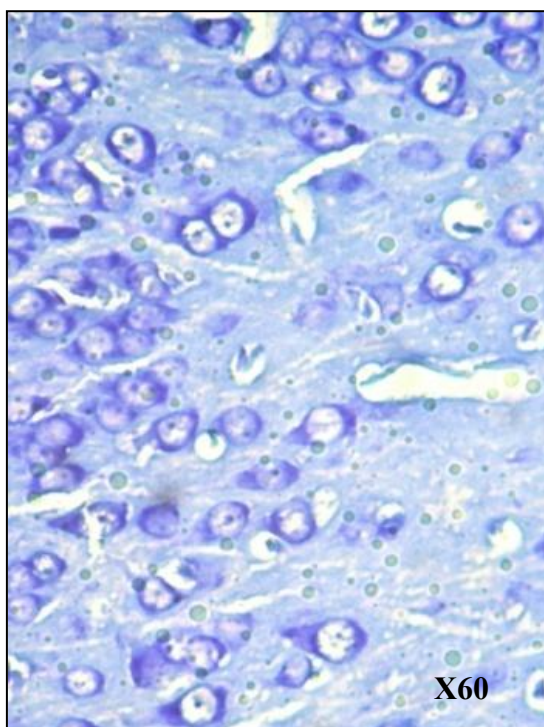
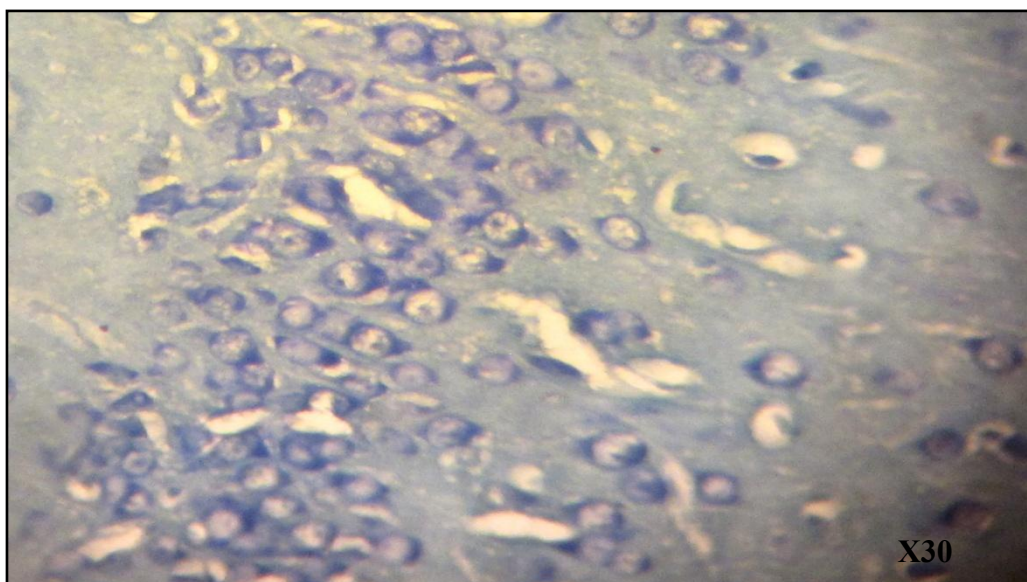
Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что систематическое в/б введение ноопепта в дозе 0.5 мг/кг приводит улучшению гистоморфологических показателей на исследуемых сроках ишемии. Характер наблюдаемых под влиянием ноопепта изменений свидетельствует о том, что препарат хоть и не



предотвращает полностью возникающие на фоне локальной ишемии нарушения, тем не менее, способствует выживаемости жизнеспособных нейронов в этих условиях.



*Рисунок 30 (а). Рисунок 30 (б). Влияние ноопепта при ежедневном введении в дозе 0,5мг/кг, на морфологические сдвиги в мозговой ткани на 6-е сутки после ОСМА. Окраска по Нисслю.*



*Рисунок 30 (б). Влияние ноопепта при ежедневном введении в дозе 0,5мг/кг, на морфологические сдвиги в мозговой ткани на 12-е сутки после ОСМА. Окраска по Нислю.*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования последних десятилетий сформировали современный подход к лечению ишемических нарушений мозга, особая роль в котором отводится нейропротекции (Sahota P. and Savitz S.I., 2011; Arshad M., 2014; Kaur H. et al., 2013). За последние две три декады было изучено большое количество соединений, воздействующих на различные патогенетические звенья ишемического каскада. Поиск и изучение таких средств является одной из приоритетных задач современной неврологии, поскольку нарушения мозгового кровообращения, более 80% которых приходится на долю ишемического инсульта (Truelsen Th. et al., 2000), занимают одно из лидирующих мест в мире по уровню смертности и являются главной причиной потери трудоспособности (WHO Global Infobase 2015).

В указанном плане большой интерес в создании новых лекарственных средств представляют эндогенные нейропептиды. Перспектива их использования в качестве нейропротекторов обусловлена в первую очередь разнонаправленностью их фармакологического действия. При этом, наиболее приоритетным в данной области считается создание коротких аналогов, имитирующих концевые фрагменты эндогенных олигопептидов, поскольку они обладают большей метаболической устойчивостью, лучше проникают через ГЭБ и обладают менее выраженной периферической активностью по сравнению со своими полипептидными аналогами.

В связи с этим нами было предпринято исследование по изучению ноопепта - нового препарата, разработанного в НИИ Фармакологии РАМН в качестве ноотропного средства в структуру которого входят аминокислоты пролин и глицин. Наш выбор был остановлен на ноопепте (этиловый эфир N-фенацетил-L-пролилглицина) исходя из ряда особенностей этого соединения. Установлено, что он обладает выраженным мнемотропным, антиамнестическим действием и стимулирующим влиянием на метаболизм мозга (Островская Р.У. и соавт., 2006). В различных экспериментальных моделях было показано, что дипептид обладает антиоксидантным, антитромботическим, противовоспалительным действием и оказывает холинопозитивное влияние (Островская Р.У. и соавт., 2001). Кроме того,

фармакокинетической особенностью препарата является образование активного метаболита - цикло-пролил-глицина (Луценко В.К. и соавт., 2003; Калинина Т.С. 2007).

Принимая во внимание вышеуказанное, нами было изучено влияние ноопепта на церебральную гемодинамику и нейроповеденческие последствия ишемических нарушений мозга. Поставленная цель была осуществлена исследованием влияния ноопепта на локальный мозговой кровоток и микроциркуляторное русло при нарушениях церебральной гемодинамики в условиях перевязки общей сонной артерии, а также процессы обучения и памяти и поведенческие реакции животных при окклюзии средней мозговой артерии, уровень липофусцина в ишемизированной мозговой ткани крыс и вызванные ишемией морфологические сдвиги в мозговой ткани.

Изучение влияния ноопепта на локальный мозговой кровоток при окклюзии правой сонной артерии методом лазерной доплерографии в теменной области ипсилатерального полушария показало, что односторонняя окклюзия сопровождается статистически достоверным уменьшением величины МК на  $24.02 \pm 1,32\%$  от исходного уровня. В/б введение ноопепта в дозе 1 мг/кг способствовало увеличению мозгового кровотока, которое к 30-ой минуте после введения препарата оказалось статистически достоверным и достигло своего максимального значения к 60-й минуте. По существу введение дипептида в указанной дозе способствовало восстановлению мозгового кровотока почти до исходного уровня. При этом отмеченные сдвиги носили стабильный характер вплоть до 90 минуты. Дальнейшее увеличение дозы препарата по своей эффективности уступало аналогичным изменениям, зарегистрированным при введении ноопепта в дозе 1 мг/кг и, восстановление величины МК в этом случае не наблюдалось даже к концу эксперимента. Полученные результаты коррелируют с литературными данными относительно диапазона эффективных антиамнестических и анксиолитических доз ноопепта от 0,5-1,2 мг/кг и куполообразной зависимости доза-эффект.

Исследование влияния ноопепта на показатели системного артериального давления и частоту сердечных сокращений неинвазивным методом "tail-cuff" на бодрствующих животных показало, что однократное в/б введение препарата в дозе 1 мг/кг не приводит к статистически значимому изменению как систолического, так и диастолического давления.

Полученные результаты позволяют предположить, что стимулирующее влияние ноопепта на кровоснабжение мозга не опосредовано изменениями системной гемодинамики.

Способность ноопепта улучшать кровоснабжение мозговой ткани была подтверждена и экспериментами, посвященными изучению влияния препарата на микроциркуляторное русло коры головного мозга крыс при перманентной ОПСА. Выбранный с этой целью безинъекционный Са-аденозинтрифосфатный метод А. М. Чилингаряна (1977), показал, что на фоне перевязки наблюдаются выраженные изменения в капиллярном сосудистом русле как ипсилатерального, так и контралатерального полушарий выражавшиеся, прежде всего, в статистически значимом уменьшении как количества, так и диаметра функционирующих капилляров. Полученные данные, по существу, согласуются с отмеченными и другими авторами наблюдениями о том, что даже односторонние нарушения микроциркуляции головного мозга могут инициировать патологические изменения в контралатеральном, неповрежденном полушарии. Анализ распределения капилляров по диаметру также подтвердил развитие наблюдаемых ишемических нарушений. Если у крыс интактной группы диаметр функционирующих капилляров колебался в большем диапазоне значений, то при ОПСА резко уменьшалось количество капилляров диаметром более 5 мкм, особенно на ипсилатеральной стороне. Оказалось, что введение ноопепта в дозе 1 мг/кг позволяет устранять наблюдаемые нарушения в микроциркуляторном русле, путем статистически достоверного увеличения процента функционирующих капилляров обоих полушарий практически до исходного значения. Аналогичная тенденция изменений подтвердилась также и достоверным увеличением диаметра функционирующих капилляров в срезах правого и левого полушарий. Под влиянием препарата наблюдалось увеличение количества капилляров диаметром более 5 мкм, причем указанное действие было наиболее выражено в контралатеральном полушарии. Немаловажным является и то, что срезах мозга группы животных получавших ноопепт, ни в одном из полей зрения не выявлялись сосуды, диаметром менее 2,5 мкм, которые принято характеризовать как нефункционирующие.

Способность ноопепта оказывать защитное влияние на мозговую ткань в условиях ее ишемизации была оценена исследованием нейроповеденческих последствий, а также нарушений памяти, вызванных локально ишемическими нарушениями в модели ОСМА.

Тестирование животных в модели “открытое поле” показало, что перевязка СМА сопровождается выраженным достоверным снижением двигательной активности по всем оцениваемым параметрам на 6-е сутки после оперативного вмешательства. Статистический анализ полученных данных показал, что ежедневное в/б введение ноопепта в дозе 0,5 мг/кг приводит к увеличению локомоторной активности, и на 6-е сутки после операции достоверно по сравнению с контрольной группой повышается как периферическая активность, так и количество вертикальных стоек. При увеличении продолжительности ишемии до 12 суток, были зарегистрированы аналогичные с 6-ми сутками перевязки изменения. Что касается количества актов груминга, относимых рядом исследователей к категории комфортного поведения, то оно достоверно снижалось по сравнению с исходным уровнем на фоне ОСМА как на 6-е, так и на 12-е сутки, а под действием препарата наблюдалось достоверное увеличение указанного параметра во все исследуемые сроки. При оценке эмоциональности животных в том же тесте по количеству актов дефекации нам не удалось зарегистрировать статистически достоверных изменений ни при ишемии, как при введении ноопепта, так и на фоне ОСМА.

Более детально способность ноопепта устранять тревожность, вызванную ишемическими нарушениями, была изучена в тесте ПКЛ. Как свидетельствуют полученные данные, на фоне ишемии наблюдается развитие тревожности и подавление исследовательской активности животных. Причем, наблюдаемое при ОСМА развитие тревожности было наиболее выражено на 6-е сутки и характеризовалось достоверным уменьшением всех параметров, характеризующих поведение животных в ПКЛ: времени и % заходов в ОР, общего числа заходов и времени, проведенного в центре лабиринта по сравнению с исходным уровнем. Введение ноопепта в дозе 0,5 мг/кг ежедневно на фоне окклюзии предотвращало развитие тревожности, увеличивая указанные параметры поведения крыс не только по сравнению с контрольной группой, но и исходным уровнем. В более поздние сроки ишемии картина наблюдаемых при ОСМА нарушений оказалась менее выраженной, и через 12 суток после ишемии статистически достоверное уменьшение наблюдалось не для всех исследуемых параметров. Введение ноопепта характеризовалось достоверным увеличением общего числа заходов и % заходов в ОР по сравнению с

контрольной группой. Обращает на себя внимание тот факт, что изменения таких важных показателей как время в открытых рукавах и центре лабиринта, хотя и оказались недостоверными по сравнению с окклюзией, однако их значения почти достигали исходного уровня. По существу полученные данные показали, что выявленная ранее анксиолитическая активность ноопепта довольно выражено проявляется и в условиях локально ишемических нарушений мозга, особенно на 6-е сутки, на фоне более выраженной тревожности животных.

Защитное влияние ноопепта было исследовано также и при оценке вызванных ишемией нарушений моторной координации. С этой целью на фоне ОСМА крысы тестировались в установке "Rota-road". Как показали результаты проведенных исследований ОСМА сопровождалась значительным уменьшением времени удерживания животных на вращающемся стержне: так, на 6-е сутки снижение составило 57,4%, а на 12-е сутки - 79,87%. При этом изменялось не только время удерживания, но и увеличивалось количество животных, не способных удерживаться на стержне более 90 сек. Введение ноопепта сопровождалось почти полным устранением нарушений координации на 6-е сутки, а к 12-ым суткам введение препарата у большинства, сопровождалось увеличением времени удерживания выше исходных значений. Улучшение моторной координации под влиянием препарата подтверждается также расчетом процентного соотношения животных с различными показателями времени удерживания. Так, на 12-е сутки после приема препарата, более 50% крыс удерживались на стержне более 90 секунд, причем количество особей с показателями более 180 секунд увеличилось втрое по сравнению с исходным уровнем.

Способность ноопепта предотвращать нарушения памяти и обучения животных была подтверждена исследованием влияния ноопепта на сохранность памятного следа в модели УРПИ. Результаты проведенных исследований позволили установить, что препарат обладает способностью устранять нарушения памяти, вызванные перевязкой средней мозговой артерии. Так, достоверное уменьшение латентного времени захода в темную камеру при ОСМА наблюдалось как на 6-е, так и, особенно, на 12 сутки эксперимента, что свидетельствует о нарушении сохранности памятного следа. Введение ноопепта устраняло отмечаемые нарушения памяти, что носило более выраженный характер на 12 сутки. Эффективность препарата в тесте УРПИ проявлялась не только в отношении латентного

времени захода в темный отсек, но и количества животных, сохранивших память после ишемии. Так, если в условиях перевязки превалировало количество животных, которые в связи с нарушением сохранности памятного следа заходили в темную камеру, то после введения препарата на всех исследуемых сроках доминировало количество крыс, избегнувших захода.

Таким образом результаты проведенных исследований не оставляют сомнений относительно эффективности ноопепта в устранении нейроповеденческих последствий и нарушений памяти и обучения при ишемии. Несомненно в реализации отмеченных эффектов вовлечена выявленная ранее в экспериментах *in vitro* антиоксидантная активность ноопепта поскольку у многих других препаратов с антиоксидантной активностью выявлено нейропротекторное действие. В связи с этим было исследовано влияние ноопепта на содержание липофусцина в мозговой ткани при ОСМА. В последние годы интерес к липофусцину возрос не только как к маркеру старения и оксидативного стресса, но и в связи с его накоплением при ишемии. Липофусцин – один из конечных продуктов перекисного окисления липидов, является смесью веществ белковой и липидной природы и содержит небольшое количество углеводов и следы металлов, в особенности железа. При оценке количественных изменений содержания липофусцина в головном мозге на фоне локальной ишемии было выявлено, что после перевязки имело место достоверное увеличение содержания пигмента как в поврежденном, так и интактном полушариях головного мозга животных на исследуемых сроках ишемии. Следует отметить, что содержание липофусцина в левом и правом полушариях у интактных животных изначально не было одинаковым. Статистический анализ данных показал, что содержание пигмента старения в левом и правом полушариях у неоперированных животных отличается в 1,51 раза. Как показали результаты проведенных исследований внутрибрюшинное введение ноопепта в условиях ОСМА на 6-е сутки привело к достоверному уменьшению содержания исследуемого пигмента, как в поврежденном, так и в интактном полушариях, по сравнению с таковыми у животных, не получавших препарат. На двенадцатые сутки эксперимента способность ноопепта предотвращать накопление пигмента была более выраженной. Следует отметить, что, несмотря на положительные сдвиги в количественном содержании пигмента в исследуемые



сроки ишемии, наблюдаемая межполушарная асимметрия так и не достигла своего исходного значения.

Нейропротективные свойства ноопепта подтвердились также и морфологическим исследованием структурных сдвигов при ОСМА. Морфологические исследования показали, что после ОСМА наблюдаются патологические изменения, характеризующиеся картиной очагового лизиса тигроидного вещества, как в коре, так и гиппокампе и подкорковых структурах. Отмеченные сдвиги наблюдались на 6-е сутки ишемии, а на 12 сутки картина патологических изменений усугублялась процессом тотального тигролиза нейроцитов, в то время как в срезах мозга животных интактной группы наблюдались хорошо очерченные контуры клеточной и ядерной поверхности, а субстанция цитоплазмы была хроматофильна. При в/б введении ноопепта в дозе 0,5 мг/кг в течение 6 суток после ОСМА на фоне лизиса в цитоплазме нейронов отмечалось тенденция к восстановлению тигроидного вещества. В срезах мозга группы животных, получавших ноопепт в течение 12 суток после ОСМА нейроны с распадом тигроидного вещества выявлялись в сравнительно меньшем количестве, а в сохранившихся клетках наблюдалось относительно хорошее окрашивание тигроидного вещества, ядра нейронов были более светлыми, чем в срезах группы животных, не получавших препарат на данном сроке ишемии. По существу отмеченные под влиянием ноопепта признаки восстановления гистоструктуры исследуемых областей свидетельствуют о способности препарата повышать выживаемость жизнеспособных нейронов в условиях ишемии.

Таким образом, проведенный комплекс исследований по изучению влияния ноопепта на церебральную гемодинамику и нейроповеденческие последствия ишемических нарушений мозга показал способность ноопепта стимулировать ЛМК и микроциркуляцию мозга в условиях их нарушения, предотвращать накопление липофусцина и развитие морфологических сдвигов, характерных для локальной ишемии, что проявлялось в усилении общей двигательной активности, моторной координации, а также предотвращении тревожности и потери памяти в условиях ишемии. Все это открывает перспективы для применения ноопепта как средства для улучшения кровоснабжения мозга и предотвращения психоневрологических последствий ишемии.

## ВЫВОДЫ

1. Ноопепт в дозе 1 мг/кг проявляет способность стимулировать нарушенный локальный мозговой кровоток без существенных изменений со стороны системного артериального давления.
2. В условиях нарушений кровоснабжения мозга, вызванных односторонней окклюзией общей сонной артерии, ноопепт улучшает микроциркуляцию коры головного мозга путем увеличения количества и диаметра функционирующих капилляров.
3. При локально ишемических нарушениях мозга введение ноопепта предотвращает развитие тревожности, что наиболее выражено на 6-е сутки после перевязки средней мозговой артерии.
4. Ноопепт снижает выраженность неврологического дефицита, наблюдаемого в условиях локальной ишемии мозга, что проявляется улучшением локомоторной и исследовательской активности, а так же моторной координации.
5. Выявлено, что ноопепт в условиях ОСМА препятствует нарушению сохранности памятного следа, что более выражено проявляется при увеличении сроков введения препарата до 12-ти суток.
6. Установлено, что ноопепт предотвращает характерное для ишемизации мозговой ткани накопление липофусцина, что указывает на один из возможных механизмов антиоксидантного эффекта препарата.
7. Полученные данные относительно способности ноопепта стимулировать кровоснабжение мозга и предотвращать развитие в условиях локальной ишемии неврологического дефицита открывают перспективы для применения препарата, как средства для коррекции нарушений кровоснабжения мозга и вызванных ими психоневрологических последствий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Dempsey R.J. Phospholipase A2 , hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia// *Antioxidants and redox signaling* – 2003- vol. 5 № 5, p. 647-654.
2. Albers G.W., Goldstein L.B., Hall D., [Lesko L.M.](#) Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial// *Journal of the American Medical Association* - 2001- vol. 286 №21- p.2673-2682.
3. Anderton B.H. Changes in the ageing brain in health and disease// *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* – 1997- vol. 352 – p. 1781-1792.
4. Arshad M. Neuroprotection in Stroke: Past, Present, and Future// *ISRN neurology* [electronic resource] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1709/> – 2014 - vol. 2014 - p.1-17.
5. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury// *Cellular and Molecular Life Sciences* – 2004 - vol. 61 №6 –p. 657-668.
6. Ayata C., Dunn A.K., Gursoy-Özdemir, Huang Zh., Boas D.A., Moskowitz M.A. Laser-speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex// *Journal of cerebral blood flow and metabolism* –2004 – vol. 24 №7 – p. 744-755.
7. Bakiri Y., Hamilton N.B. Karadottir R. Attwell D. Testing NMDA receptor block as a therapeutic strategy for reducing ischaemic damage to CNS white matter// *Glia* – 2008 - vol. 56 №2 – p. 233-240.
8. Belnik A.P., Ostrovskaya R.U., Poletaeva I.I. Genotype-dependent characteristics of behavior in mice in cognitive tests. The effects of noopept// *Neuroscience and behavioral psychology* – 2009 – vol.39 №1 –p. 81-86.
9. Bickerdike M.J, [Thomas G.B.](#), Batchelor D.C., Sirimanne E.S., [Leong W.](#), [Lin H.](#), [Sieg F.](#), [Wen J.](#), [Brimble M.A.](#), [Harris P.W.](#), [Gluckman P.D.](#) NNZ-2566: a Gly-Pro-Glu analogue with neuroprotective efficacy in a rat model of acute focal stroke// *Journal of the neurological sciences* – 2009 – vol. 278 №1-2 – p. 85-90.
10. Borlongan C.V., Cahill D.W., Sanberg P.R. Locomotor and passive avoidance deficits following occlusion of the middle cerebral artery// *Physiology and behavior* – 1995 – vol. 58 № 5 – p. 909-917.

11. Bourgault S., Vaudry D., Dejda A., Doan N.D., Vaudry H., Fournier A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective peptide// *Current medicinal chemistry* – 2009 – vol. 16 - p.4462-4480.
12. Bourguignon J.P., Gerard A. Role of insulin-like growth factor binding proteins in limitations of IGF-1 degradation into the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist GPE: evidence from gonadotropin-releasing hormone secretion in vitro at two development stages// *Brain researches* – 1999 – vol. 847 – p. 247-252.
13. Brunk U.T. and Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis// *European journal of biochemistry / FEBS* - 2002 - vol. 269 - p.1-7.
14. Bruno V., Battaglia G., Copani A., D'Onofrio M., Iorio P. Di., De Blasi A., Melchiorri D, Flor P.J., Nicoletti F. Metabotropic Glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs// *Journal of cerebral blood flow and metabolism* – 2001 – vol. 21 - p. 1013–1033.
15. Buccafusco J.J. *Methods of behavioral analysis in neuroscience*// CRC Press LLC – 2001 – p. 329.
16. Cervia D., Casini G. The neuropeptide systems and their potential role in the treatment of mammalian retinal ischemia: a developing story// *Current neuropharmacology* – 2013 – vol 11 №1 – p. 95-101.
17. Chan Yin-Ch., Hosoda K., Tsai Chin-Ju, Yamamoto Sh., Wang Minn-Fu. Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological changes in senescence-accelerated rats// *Journal of nutritional science and vitaminology* – 2006 – vol. 52 - p. 266-273.
18. 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// *Journal of the AHA Stroke* – 1986 – vol. 17 № 4 - p. 738-743.
19. Colak G., Filiano A., Johnson Gail V.W. The application of permanent middle cerebral artery ligation in the mouse// *JOVE Journal of Visualized Experiments* [www.jove.com](http://www.jove.com) – 2011 – vol. 53.
20. Cortes-Sol A., Lara-Garsia M., Alvarado M., Hudson R., Berbel P., Pacheco P. inner capillary diameter of hypothalamic paraventricular nucleus of female rat increases during lactation// *BioMed Central neuroscience [electronic resource]* – 2013- vol. 14 №7 –p.1-8.
21. Courtney de V.A., Nelson R.J., Traysman R.J., Hurn P.D. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful?// *Neuroscience and biobehavioral review* – 2001- vol. 25 - p. 325-342.

22. Csallany A.S., Ayaz K.L. Quantitative determination of organic solvent soluble lipofuscin pigment in tissues// *Lipids* -1987 - vol.11 №5 – p. 412-417.
23. Daugherty A., Rateri D., Hong L., Balakrishnan A. Measuring blood pressure in mice using volume pressure recording, a Tail-cuuf method// *JOVE Journal of Visualized Experiments* [www.jove.com](http://www.jove.com) – 2009 – vol. 27.
24. del Zoppo G.J., Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia// *Journal of cerebral blood flow and metabolism* – 2003- vol. 23 – p. 879–894.
25. Diener H.C., Cortens M., Ford G., [Grotta J.](#), [Hacke W.](#), [Kaste M.](#), [Koudstaal P.J.](#), [Wessel T.](#) Lubeluzole in acute ischemic stroke treatment: A double-blind study with an 8-hour inclusion window comparing a 10-mg daily dose of lubeluzole with placebo// *Journal of the AHA Stroke* – 2000 – vol. 31 № 11 - p. 2543-2551.
26. Ding L., Kuhne W.W., Hinton D.E., Song J., Dynan W.S. Quantifiable biomarkers of normal aging in the Japanese Medaka fish (*Oryzias latipes*)// *Public Library of Science one* [electronic resource] <http://www.plosone.org/> - 2010- vol. 5 №2- p. 1-11.
27. [Dirnagl U.](#) Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research// *Journal of cerebral blood flow and metabolism* – 2006- vol. 26 № 12 – p. 65-78.
28. Donnan G.A., Fisher M., Macleod M., Davis S.M. Stroke// *The Lancet* – 2008 – vol. 371 №9624 – p.1612-1623.
29. Durduran T., Burnett M.G., Yu G., Zhou Ch., Furuya D., Yodh A.J., Detre J.H., Greenberg J.H. Spatiotemporal quantification of cerebral blood flow during functional activation in rat somatosensory cortex using laser-speckle flowmetry// *Journal of cerebral blood flow and metabolism* –2004 – vol. 24 №5– p. 518-525.
30. Edvinsson L. and Krause D.N. Cerebral blood flow and metabolism// *Lippincott Williams and Willis*, second edition, USA – 2002 - p. 521
31. ElAli A., Theriault P., Rivest S. The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders// *International Journal of Molecular Sciences* – 2014 - vol. 15 – p. 6453-6474.
32. Faden A.I., Fox G.B., Fan L., Araldi J.L., Qiao L., Wang S., Kozinowski A.P. Novel TRH analog improves motor and cognitive recovery after traumatic brain injury in rodents// *American Journal of physiology – Regulatory, integrative and comparative physiology* – 1999 – vol. 277 – p. R1196-R1204.

33. Faden A.I., Movsesyan V.A., Knoblach S.M., Ahmed F., Cernak I. Neuroprotective effects of novel small peptides in vitro and after brain injury// *Neuropharmacology* –2005—vol. 49.- p. 410-424.
34. Fagan S.C., Hess D.C., Hohnadel E.J., David M. P., Ergul A. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke// *Journal of the AHA Stroke* – 2004 – vol. 35 № 9 – p.2220-2225.
35. Feng M., DiPietro K. Non-invasive blood pressure measurement in mice// *Methods in Molecular Biology* – 2009- vol. 573 – p.45-55.
36. Feng M., Whitesall S., Zhang Y., Beibel M., D' Alecy L., DiPetrillo K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements// *American Journal of Hypertension* - 2008 – vol. 21 №12 – p.1288-1291.
37. Feuerstein G.Z., Zaleska M.M., Krams M., Wang X., Day M., Rutkowski J.L., Finklestein S.P., Pangalos M.N., Poole M., Stiles G.L., Ruffolo R.R., Walsh F. L. Missing steps in the STAIR case: a translational medicine perspective on the development of NXY-059 for treatment of acute ischemic stroke// *Journal of cerebral blood flow and metabolism* – 2008 – vol. 28 №1 – p. 217-219.
38. Fisher M., Feuerstain G., Howells D.W., Hurn P.D., Kent T.A., Savitz S.I., Lo E.H. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations// *Journal of the AHA Stroke* – 2009- vol. 40 №6 – p. 2244-2250.
39. Fisher M., Schaebitz W. An overview of acute ischemic stroke therapy. Past, present and future // *Archivos de medicina interna* – 2000- vol. 160 №11 – p. 3196-3206.
40. Flatcher B.L., Dillard B.L. Tappel A.L. Measurement of lipid peroxidation products in biological systems and tissues// *Analytical biochemistry* – 1973 – vol. 52 №1 - p. 1-9.
41. Fonseca D.B., Brancato C.L., Prior E.A., Shelton P.M.J, Sheehy M.R.J. Death rates reflect accumulating brain damage in arthropods// *Proceedings of the Royal Society B: Biological sciences* – 2005 – vol. 272 – p. 1941-1947.
42. Georgakopoulou E.A., Tsimaratou K., Evangelou K., Fernandez Marcos-P.J., zoumpourlis V., Trougakov I.P., Kletsas D., Bartek J., Serrano M., Gorgoulis V.G. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissue// *Aging* – 2013- vol. 5 №1 –p. 37-50.
43. Giaccone G., Orsi L., Cupidi Ch., Tagliavini F. Lypofuscine Hypothesis of Alzheimer's Disease// *EXTRA Dementia and geriatric cognitive disorders* – 2011- №1 – p.292-296.

44. Ginsberg M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future// *Neuropharmacology* - 2008 – vol. 55 №3 – p. 363–389.
45. Ginsberg M.D. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia. Synoptic overview// *Journal of the AHA Stroke* – 2009 – vol. 40 №1 – p. 111-114.
46. Gladstone D.J., Black S.E., Hakim A.M. Lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutics directions// *Journal of the AHA Stroke* – 2002- vol. 33 №5 – p. 2123-2136.
47. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S.H., Ford E.S., Fox C.S., Franco S.H., Fullerton H.J., Gillespie S.M., Hailpern S.M., Heit J.A., Howard V.J., Huffman M.D., et al. Heart disease and stroke statistics – 2013 update: A report from the American Heart Association// *Journal of the AHA Stroke* – 2013 – vol. 127 № 1/8 - p. e131-e159.
48. Greenberg D.A. and Jin K. Growth factors and stroke// *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* - 2006 - vol. 3 № 4 p. 458 – 465.
49. Guan J., Bennet L., George S.H., Wu D., Waldvogel H.J., Gluckman P.D., Faul R.L.M., Croiser P.S., Gunn A. Insulin-like growth factor-1 reduces postischemic white matter injury in fetal sheep// *Journal of cerebral blood flow and metabolism* – 2001 – vol. 21 №5 – p. 493-502.
50. Guan J., Gluckman P.D. IGF-1 derived small neuropeptides and analogues: a novel strategy for the development of pharmaceuticals for neurological conditions// *British Journal of Pharmacology* - 2009 – vol. 157 №6 – p. 881-891.
51. Guan J., Mathai S., Harris A.P., Wen J.Y., Zhang R., Brimble M.A., Gluckman P. Peripheral administration of a novel diketopiperazine, NNZ2591, prevents brain injury and improves somatosensory-motor function following hypoxia-ischemia in adult rats// *Neuropharmacology* – 2007 - vol. 53 №6 – p. 749-762.
52. Guan J., Thomas G.B., Lin H., Mathai S., Bachelor D.C., George S. et al. Neuroprotective effects of the N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-1, glycine-proline-glutamate (GPE) following intravenous infusion in hypoxic-ischemic adult rats// *Neuropharmacology* – 2004—vol. 47 –p. 892-903.
53. Guan J., Waldvogel H.J., Faul R.L., Gluckman P.D., Williams C.E. The effects of the N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-1, glycine-proline-glutamate in different regions following hypoxic-ischemic brain injury in rats// *Neuroscience* – 1999 – vol. 89 – p. 649-659.
54. Gustavsson M., Mallard C., Vannucci S.J. Wilson Mary-A., Johnston M.V, Hagberg H. Vascular response to hypoxic preconditioning in the immature brain// *Journal of Cerebral Blood*

Flow and Metabolism – 2007- vol. 27 – p. 928–938.

55. Hacke W., Kaste M., Bluhmki E. Brozman M., Dávalos A., Guidetti D., Larrue V., Lees K.R., Medeghri Z., Machnig Th., Schneider D., von Kummer R., Wahlgren N. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke// The New England Journal of Medicine – 2008 – vol. 359 №12 – p. 1317-1329.

56. Hall C.N., Reynell C., Gesslein B., Hamilton N.B., Mishra A., Sutherland B.A., O’Farrell F.M., Buchan A. M., Lauritzen M., Attwell D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease// Nature – 2014 – vol. 508 – p. 55-70.

57. Harada Sh., Fujita-Hamabe W., Tokuyama Sh. Effect of Orexin-A on postischemic glucose intolerance and neuronal damage// Journal of pharmacological sciences – 2011 – vol. 115 –p. 155-163.

58. Harada Sh., Fujita-Hamabe W., Tokuyama Sh. Ischemic stroke and glucose intolerance: a review of the evidence and exploration of novel therapeutics targets// Journal of pharmacological Sciences – 2012 – vol. 118 – p. 1-13.

59. Harris P.W. Brimble M.A., Muir V.J., Lai M., Trotter N.S. Callis D.J. Synthesis of proline-mediated analogues of the neuroprotective agent glucyl-l-proline-glutamic acid (GPE). // Tetraedron – 2005– vol. 61 – p. 10018-10035.

60. Hauck E.F., Apostel S., Hoffman J., Haimann A., Kempinski O. Capillary flow and diameter changes during reperfusion after global cerebral ischemia studied by intravital video microscopy// Journal of cerebral blood flow and metabolism – 2004 – vol. 24 №4 – p. 383-391.

61. Hinkle J.L., Bowman L. Neuroprotection for ischemic stroke// Journal of Neuroscience Nursing – 2003 – vol. 35 №2 –p. 114-118.

62. Hirakawa M., Tamura M., Nagashima H., Nakayama H., Sano K. Disturbance of retention of memory after focal cerebral ischemia in rats// Journal of the AHA Stroke – 1998 – vol. 29 № 12 – p. 2471-2475.

63. Hofmeijer J, van Putten MJ. Ischemic cerebral damage: an appraisal of synaptic failure// Journal of the AHA Stroke – 2012 – vol. 43 № 2 - p. 607-615.

64. Hökfelt T., Bartfai T., Bloom F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery// The Lancet Neurology – 2003 – vol. 2 №8 – p. 463-472.



65. Hökfelt T., Broberger C. Xu Zh. D., Sergeev V., Ubink R., Diez M. Neuropeptides – an overview// *Neuropharmacology* – 2000 –vol. 39 –p. 1337-1356.
66. Hori M., Nakamachi T., Rakwai R., Shibato J., Ogawa T., Aiuchi T., Tsuruyama T., Tamaki K., Shioda S. Transcriptomics and proteomics analyses of the PACAP38 influenced ischemic brain in permanent middle cerebral artery occlusion in mice// *Journal of neuroinflammation* – 2012 – vol. 9 – p. 256-274.
67. Hoyer D., Bartfai T. Neuropeptides and neuropeptide receptors: Drug targets, and peptide and non-peptide ligands: attribute to prof. Dieter Seebach// *Chemistry and Biodiversity* – 2012 – vol. 9 –p. 2367-2387.
68. Hoyte L., Barber P.A., Buchan A.M., Hill M.D. The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke// *Current molecular medicine* – 2004- vol. 4 №2 p.-131-137.
69. Illiott W.J., Bandari A. The role of calcium antagonists in stroke prevention// *J Clin Hypertens (Greenwich)* – 2005- vol. 4 №1 – p.5-8.
70. Ito Y. Araki N. Calcium antagonists: current and future applications based on new evidence. Neuroprotective effect of calcium antagonists// *Clinical calcium*– 2010- vol. 20 № 1 – p.83-88.
71. Kahle M.P., Bix G.J. Successfully climbing the «STAIRs»: Surmounting failed translation of experimental ischemic stroke treatments// *Stroke research and treatment* – 2012 - vol. 2012 - p. 1-8.
72. Karbowski J. Scaling of brain metabolism and blood flow in relation to capillary and neural Scaling// *Public Library of Science one [electronic resource]* [//www.plosone.org/](http://www.plosone.org/)- 2011 – vol. 6 № 10 –p. 1-11.
73. Kaur R., Prakash A., Medhi B. Drug therapy in stroke: from preclinical to clinical studies// *Pharmacology* – 2013 – vol. 92- p.324-334.
74. [Kidwell C.S.](#), [Lees K.R.](#), [Muir K.W.](#) Results of the MRI sub study of the intravenous magnesium efficacy in stroke trial// *Stroke* – 2009 – vol. 40 №5 – p.1704-1713.
75. Kimmerlin T., Seebach D. 100 years of peptide synthesis: ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to beta peptides assemblies// *Journal of peptide research* – 2005 – vol. 65 №2 – p. 229-260.
76. Kiselyov K., Jennigs J.Jr, Rbaibi Y., Chu Ch. T. Autophagy, mitochondria and cell death in lysosomal storage disease// *Autophagy* – 2007- vol. 3 №3- p.259-262.

77. Kohjimoto Y., Ogawa T., Matsumoto M., Shirakawa K., Kuwaki T., Yasuda H., Anami K., Fujii T., Satoh H. Ono T. Effects of acetyl-L-carnitine on the brain lipofuscine content and emotional behavior in aged rats// Japan journal of pharmacology – 1988 – vol. 48 – p. 365-371.
78. Koskinen Lars-Owe. D. Effects of low intravenous doses of TRH, acid\_TRH and cyclo(His-Pro) on cerebral and peripheral blood flow// British Journal of Pharmacology - 1986 - vol. 87 - p. 509-519.
79. Kubota Y., Umegaki K., Kagota S., Tanaka N., Nakamura K., Kunitomo M., Shinozuka K. Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods (without heating) in spontaneously rats// Biological & pharmaceutical bulletin – 2006- vol. 29 №8 – p. 1756-1758.
80. Kurtz Th.W., Griffin K.A., Bidani A.K., Davisson R.L., Hall J.E. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals part 2: Blood pressure measurement in experimental animals// AHA Hypertension – 2005 – vol. 45 №2 – p. 299-310.
81. Laas R., Igloffstein J. Cerebral infarction due to carotid acclusion and carbon monoxide exposure. I. Influence of preganglionic cervical sympthoectomy// Jornal of neurology, neurosurgery and pshychiatry – 1983 – vol. 46 – p.768-773.
82. Lai T.W., Zhang Sh., Wang T.Y. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection// Progress in neurology – 2014—vol. 115 –p. 159-188.
83. Lazarovici P., Cohen G., Arien-Zakay H., Chen J., Zhang Ch., Chopp M., Jiang H. Multimodal neuroprotection induced by PACAP38 in oxygen-glucose deprivation and middle cerebral artery occlusion stroke models// Journal of molecular neuroscience – 2012 – vol. 48 №3 – p. 526-540.
84. Ley J.D., Nshmyumuremyi J.B., Leusen I. Hemispheric blood flow in the rat after unilateral common carotid occlusion: evolution with time// Journal of the AHA Stroke – 1985 – vol. 16 №1 – p. 69-73.
85. Liu X.F., Fawscett J.R., Thorne R.G., Frey W.H. 2<sup>nd</sup>. Non-invasive intranasal insulin-like growth factor-I reduces infarct volume and improves neurologic function in rats following middle cerebral artery occlusion// Neuroscience letters – 2001 – vol. 308 №2 – p. 91-94.
86. Lopez-Lopez C., LeRoith D., Torres-Aleman. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain// Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2004 – vol. 101 №29 - p. 9833-9838.

87. Manaenko A., Lekic T., Tang J., Zhang J.H. NC1900, an arginine vasopressin analogue, fails to reduce brain edema and improve neurobehavioral deficits in an intracerebral hemorrhagic stroke mice model// *Acta neurochirurgica. Supplement.*– 2011 – vol. 111 – p. 155-159.
88. [Manzanero S.](#), [Santro T.](#), [Arumugam T.V.](#) Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury// *Neurochemistry international* – 2013 – vol. 62 №5 – p. 712-720.
89. McCulloch J., Kelly P.A.T. Effects of cholecystokinin octapeptide on pial arteriolar diameter// *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* – 1984 - vol. 4 №4– p.625–628.
90. McGonigle P. Peptide therapeutics for CNS indications// *Biochemical Pharmacology* – 2012 – vol. 83 – p. 559-566.
91. Mendelow A.D., Graham D.I., McCulloch J., Mohamed A.A. The distribution of ischemic damage and cerebral blood flow after unilateral carotid occlusion and hypotension in the rat// *Journal of the AHA Stroke* – 1984 – vol. 15 № 4 – p. 704-710.
92. Menken Z.B., Su Le-Chu., Ayaz K.L., Csallany A.S. Organic solvent-soluble lipofuscin pigments and glutathione peroxidase in mouse brain and heart: effects of age and vitamin E// *The journal of nutrition* –1986 - vol. 116 - p.-350-355.
93. Menzies S.A., Hoff J.T., Betz A.L. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model// *Neurosurgery* – 1992 – vol. 31 № 1 - p. 100-107.
94. Min G., Senut M., Rajanikant K., Greenberg E., Bandaji R., Zemke D., Mousa A., Kassab M., Farooq M., Gupta R., Majid A. Differential neuroprotective effects of carnosine, anserine and N-acetyl carnosine against permanent focal ischemia// *Journal of Neuroscience Research* – 2008 – vol. 86 № 13 – p. 2984-2991.
95. Minnerup J., Sutherland B. A., Buchan A. M., Kleinschnitz C. Neuroprotection for stroke: Current status and future perspectives// *International journal of molecular medical science* – 2012 – vol. 13 №9 – p. 11753-11772.
96. Montero M., Nielsen M., Ronn L.C. et al. Neuroprotective effects of the AMPA antagonist PNQX in oxygen-glucose deprivation in mouse hippocampal slice cultures and global cerebral ischemia in gerbils// *Brain Res* – 2007- vol. 177 - p.124-135.
97. Moskowitz M.A., Lo H.E. Iadecola C., *The Science of stroke: Mechanisms in Search of Treatments*// *Neuron* – 2010- vol. 67, №2- p.181-198.

98. Muir K.W., Lees K.R., Ford I., Davis S. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): Randomized controlled trial// *The Lancet* – 2004- vol. 363 №9407 - p. 439-445.
99. Naftalin R.J., Cunningham Ph., Afzal-Ahmed I. Piracetam and TRH analogues antagonize inhibition by barbiturates, diazepam, melatonin and galanin of human erythrocyte D-glucose transport// *British journal of pharmacology* – 2004—vol. 142 №3 –p.594-608.
100. Nakamachi T., Tsuchida M., Kagami N, Yofu S., Wada Y., Hori M., Tsuchikawa D., Yoshikawa A., Imai N., Nakamura K., Arata S., Shioda S. IL-6 and PACAP receptor expression and localization after global brain ischemia in mice// *Journal of molecular neuroscience* – 2012—vol. 48 – p. 518-525.
101. Nezvamov G.G., Teleshova E.S. Comparative studies of noopept and piracetam in the treatment of patients with mild cognitive disorders in organic brain disease of vascular and traumatic origin// *Neuroscience and behavioral* – 2009 – vol. 39 №3 – p. 311-321.
102. O'Collins E.V., Macleod M.R., Donnan G.A., Horkey L.L., van der Worp B.H., Howells D.W. 1,026 Experimental treatments in acute stroke// *Annals of neurology* – 2006 – vol.59 №3 – p. 467-477.
103. Ohtaki H., Nakamachi T., Dohi K., Aizawa Y., Takaki A., Hodoyama K., Yofu S., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., Kopf M., Iwakura Y., Matsuda K., Arimura A., Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6// *PNAS* – 2006 – vol. 103 №19 – p. 7488-7493.
104. Ok-Nam Bae, Serfozo K., Baek S.-H., Lee K.Y., Dorrance A., Rumbeiha W., Fitzegerald S.D., Farooq U. M., Naravelta Bh., Bhatt A., Majid A. Safety and efficacy evaluation of carnosine, an endogenous neuroprotective agent for ischemic stroke// *Journal of the AHA Stroke* – 2013 - vol. 44 №1 –p. 205-212.
105. Omae T., Mayzel-Oreg O., Li F., Sotak Ch.H., Fisher M. Inapparent hemodynamic insufficiency exacerbates ischemic damage in a rat microembolic stroke model// *Journal of the AHA Stroke* – 2000 – vol. 31 №10 – p. 2494-2499.
106. Onwuekwe I.O. and Ezeala-Adikaibe B. Ischemic stroke and neuroprotection// *Annals of medical and health sciences research.* - 2012 – vol. 2, №2 – p.186-190.
107. Østergaard L., Jespersen S.N., Mouridsen K., Jonsdóttir K., Tietze A., Blicher Y.U., Aamand R., Hjort N.K., Cai Ch., Hougaard K.D., Simonsen C.Z., et al. The role of the cerebral capillaries in

- acute ischemic stroke: the extended penumbra model// *Journal of cerebral blood flow and metabolism* – 2013 – vol. 33 №2 – p. 635-648.
108. Ostrovskaya R.U., Ozerova I.V., Gudasheva T.A., Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. Comparative activity of proline-containing dipeptide noopept and inhibitor of dipeptidyl peptidase-4 sitagliptin in rat model of developing diabetes// *Bulletin of experimental biology and medicine* – 2014 – vol. 156 №3 – p. 342-346.
109. Ostrovskaya R.U., Zolotov N.N., Ozerova I.V., Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Taraban K.V., Michunskaya A.M., Voronina T.A., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Noopept normalizes parameters of the incretin system in rats with experimental diabetes. // *Bulletin of experimental biology and medicine* – 2014 – vol. 157 №3 – p. 344-349.
110. Ostrovskaya R.U., Vakhitova Y.V., Kuzmina U. Sh., Salimgareeva M.Kh., Zainullina L.F., Gudasheva T.A., Vakhitov V.A., Seredenin S.B. Neuroprotective effect of novel cognitive enhancer noopept on AD-related cellular model involves the attenuation of apoptosis and tau hyperphosphorylation// *Journal of Biomedical Science* - 2014 – vol. 21 №8 – p. 1-9.
111. Panichar K.S., Norenberg M.D., Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations// *Glia* – 2005 – vol. 50 - p. 287-298.
112. Pelsman A., Hayo-Vadillo C., Gudasheva T.A., Seredenin S.B., Ostrovskaya R.U., Busciglio J. GVS-111 prevents oxidative damage and apoptosis in normal and Down's syndrome human cortical neurons// *International Journal of Development Neuroscience* – 2003- vol. 21 №3 --p.117-124.
113. Perše M., Injac R., Erman A. Oxidative stress and lipofuscin accumulation in urothelial cells of bladder in aging mice// *Public Library of Science one* [electronic resource] <http://www.plosone.org/> - 2013 – vol. 8 № 3 – p. 1-11.
114. Persidsky Y., Ramirez Sh., Haorah J., Kanmogne G.D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions// *Journal of neuroimmune pharmacology* – 2006 – vol. 1 – p. 223-236.
115. Petty M.A., Wettstein J.G. Elements of cerebral microvascular ischemia// *Brain research reviews* – 2001 – vol. 36 – p. 23-34.
116. Philip M., Benatar M., Fisher M., Savitz I.S. Methodological quality of animal studies of neuroprotective agents currently in phase II/III acute ischemic stroke trials// *Journal of the AHA Stroke* -2009 – vol. 40 №12– p. 557-581.
117. Rajanikant G.K., Zemke D., Senut M.-C., Frenkel M.B., Chen A.F., Gupta R., Majid A. Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice// *Journal of the AHA Stroke* – 2007 - vol. 38 №11 –p. 3023-3031.

118. Reddy K., Fletcher B., Tappel Ad., Tappel A. Measurement and spectral characteristics of fluorescent pigments in tissues of rats as a function of dietary polysaturated fats and vitamin E// The journal of nutrition - 1973 - vol. 103 - p. 908-915.
119. Rockenstein E., Ubhi K., Doppler E., Novak Ph., Moessler H., Li B., Blanchard J., Grundke-Iqbal I., Iqbal Kh., Mante M., Adame A., Crews L., Masliah E. Regional comparison of the neurogenic effects of CNTF derived peptides and cerebrolysin in A $\beta$ PP transgenic mice// Journal of Alzheimer's disease – 2011 – vol. 27 №4 – p. 743-752.
120. Sacco R.L., Kasher S.E., Broderick J.P., Caplan L.R., Connors (Buddy) J.J., Culebras A., Elkind M.S., George M.G., Hamdan A.D., Higashida R.T., Hoh L.B., Janis L.S., Kase C.S., Kleindorfer D.O., Leen L., Moseley E.D., Peterson E.D., Turan T.N., Valderrama A.L., Vinters H.V. An update definition of stroke for the 21<sup>st</sup> century: a statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association// Journal of the AHA Stroke – 2013 – vol. 44 № 5 – p.2064-2089.
121. Sahota P. and Savitz S.I. Investigational Therapies for Ischemic Stroke: Neuroprotection and Neurorecovery// Neurotherapeutics - 2011 - vol 8 - p.434–451.
122. Samonina G., Ashmarin I., Lyapina L. Glyproline peptide family: review on bioactivity and possible origins// Pathophysiology – 2002 – vol. 8 – p. 229-234.
123. Sandercock P., Berge E., Dennis M., Forbes J., Hand P., Kwan J., Lewis S., Lindley R., Neilson A., Thomas B., Wardlaw J. A systematic review of the effectiveness, cost-effectiveness and barriers to implementation of thrombolytic and neuroprotective therapy for acute ischemic stroke in the NHS// Health technology Assessment – 2002 - vol.6 № 26 – p. 27-109.
124. Saura J., Curatolo L., Williams C.E., Gatti S., Benatti L., Peeters C., [Guan J.](#), [Dragunow M.](#), [Post C.](#), [Faull R.L.](#), [Gluckman P.D.](#), [Skinner S.J.](#) Neuroprotective effects of Gly-Pro-Glu, the N-terminal tripeptide of IGF-1, in the hippocampus in vitro// Neuroreport – 1999 – vol. 10 №1 – p. 161-164.
125. Schaar K., Brenneman M., Savitz S.I. Functional assessments in the rodent stroke model// Experimental and Translational Stroke Medicine – 2010- vol. 2 №13 – p.1-11.
126. Schurr A. Neuroprotection against ischemic/hypoxic brain damage: blockers of ionotropic glutamate receptor and voltage sensitive calcium channels// Cun-Drug Targets - 2004 vol. 5 №7 –p.

603-611.

127. Scichita T. Ito M. And Yoshimura A., Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection// Cellular Neuroscience – 2014- vol. 8 №319 - p.1-8.

128. [Small D.L.](#), [Murray C.L.](#), [Monette R.](#) [Kawasaki-Yatsugi S.](#), [Morley P.](#) Neuroprotective effects of a novel AMPA receptor antagonist, YM872// [Neuroreport.](#) – 1998 – vol. 9 №7 – p.1287-1290.

129. Solntseva E.I., Bukanova J.V., Ostrovskaya R.U., Gudasheva T.A., Voronina T.A., Skrebitsky V.G. The effects of piracetam and its novel peptide analogue GVS-111 on neuronal voltage-gated calcium and potassium channels// General Pharmacology – 1997 – vol. 29 №1 –p. 85-87.

130. Strand F.L. Neuropeptides: general characteristics and neuropharmaceutical potential in treating CNS disorders// Progress in drug research – 2003—vol. 61 –p. 1-37.

131. Sutherland B.A., Papadakis S.M., Chen R., Buchan A.M. Cerebral blood flow alteration in neuroprotection following cerebral ischemia// Journal of Physiology – 2011 – vol. 589 №17 – p. 4105-4114.

132. Svedin P., Guan J., Mathai S., Zhang R., Wang X., Gustavsson M., [Hagberg H.](#), [Mallard C.](#) Delayed peripheral administration of a GPE analogue induces astrogliosis and angiogenesis and reduces inflammation and brain injury following hypoxia-ischemia in the neonatal rat// Developmental neuroscience – 2007 – vol 29. № 4-5 – p. 393-402.

133. Seth L. Oxidative stress in brain ischemia// Brain pathology – 1999 – № 9 –p. 119-131.

134. Taguchi Y., Takashima Sh., Sasahara E., Inoue H., Ohtani O. Morphological changes in capillaries in the ischemic brain in Wistar rats// Archives of histology and cytology – 2004 – vol. 67 №3 – p. 253-261.

135. Tamura A., Graham I.D., McCulloch J., Teasdale G.M. Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion// Journal of cerebral blood flow and metabolism – 1981 – vol. 1 – p. 53-60.

136. Tata D.A., Anderson B.J. A new method for the investigation of capillary structure// Journal of neuroscience methods – 2002 – vol. 113 – p. 199-206.

137. Taussky P, Tawk RG, Daugherty W.P. [Hanel R.A.](#) Medical therapy for ischemic stroke: review of intravenous and intra-arterial treatment options// World Neurosurg – 2011- vol. 76 №6 – p. 9-15.

138. Terasaki Y., Liu Y., Hayakawa K., Pham L.D. Lo E.H., Ji.X. and Arai K., Mechanisms of neurovascular dysfunction in acute ischemic brain// Current medicinal chemistry. Cardiovascular and hematological agents.- 2014 - vol. 21, №18 - p.2035-2042.
139. Terman A.and Brunk T.U. Oxidative stress, accumulation of biological ‘garbage’, and aging// Antioxidants and redox signaling – 2006- vol.8 № 1- 2 p. 197-212.
140. Tonnesen J., Pryds A., Larsen E.H., Paulson O.B., Hauerberg J., Knudsen G.M. Laser Doppler flowmetry is valid for measurement of cerebral flow autoregulation lower limit in rats// Experimental Physiology – 2005- vol.90 №3 – p.349-355.
141. Truelsen Th., Begg S., Mathers C. The global burden of cerebrovascular disease// Global burden of Disease (GBD), Cerebrovascular disease - 2000 - p. 67.
142. Tymianski M. Novel approaches to neuroprotection trials in acute ischemic stroke// Journal of the AHA Stroke - 2013 – vol. 44 №10– p. 2942-2950.
143. Ulrich P.T., Kroppenstedt S., Heimann A., Kempinski O. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic 2-vessel occlusion model in rats// Journal of the AHA Stroke – 1998 – vol. 29 № 11 – p. 2412-2442.
144. Wang C.X., Shuaib A. NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury// Curr Drug Targets CNS Neurol Disord – 2005- vol. 4 №2 – p. 143-151.
145. WHO Global InfoBase [electronic resource] <http://www.who.int/gho/en/> - 2015
146. Woodruff T.M., Thundyl J., Tang S., Sobey C., Taylor S.M., Arumugam T.V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke// Molecular Neurodegeneration – 2011 – vol. 6 №11 – p. 1-19.
147. Wu D. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins// The Journal of the American society for experimental NeuroTherapeutics – 2005 – vol. 2 №1 – p. 120-128.
148. Xiao-Hong Xu., Tie-Qiao Zhao. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice// Acta pharmacologica Sinica – 2002 – vol. 23 №7 – p. 587-590.
149. Yakovlev A.G. and Faden A. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies// The Journal of the American society for experimental NeuroTherapeutics – 2004 – vol. 1 № – p. 5-16.



150. Yamamoto H., Murphy L.J. Enhanced proteolytic activity directed against the N-terminal of IGF-1 in diabetic rats// *Journal of Endocrinology* – 1999 – vol. 162 – p. 243-250.
151. Yemisci M. Gursoy-Ozdemir Y., Vural A., Can A., Topalkara K., Dalkara T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery// *Nature medicine* – 2009 – vol. 15 №9 – p. 1031-1038.
152. Zhang L., Zhang G.Zh. and Chopp M. The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke// *Trends in pharmacological sciences* – 2012 – vol 33 №8 – p. 415-422.
153. Zhao X., Liu S.J., Zhang J., Strong R., Aronowski J., Grotta J.C. Combining insulin-like growth factor derivatives plus caffeine produces robust neuroprotection after stroke in rats// *Journal of the AHA Stroke* – 2005 – vol. 36 – p. 129-134.
154. Zielinski S., Pörtner Hans-O. Oxidative stress and antioxidative defence in cephalopod: a function of metabolic rate or age// *Comparative biochemistry and physiology*– 2000- part B vol. 125 – p. 147-160.
155. Александрин В.В. Использование метода лазерной доплеровской флоуметрии для определения нижней границы ауторегуляции мозгового кровотока у крыс// *Методология флоуметрии* – 2000 - вып. 4 – с. 139-144.
156. Александрин В.В., Кожура В.Л., Новодержкина И.С. Асимметрия объемного кровотока в сонных артериях крыс// *Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга (материалы Всероссийской конференции с международным участием, Москва)* – 2006 - с.15-17.
157. Александрин В.В., Лунышина Е.В., Мирзоян Р.С.. Изменение локального мозгового кровотока при глобальной преходящей ишемии мозга у крыс// *Методология флоуметрии* - 2002- вып. 6 – с. 143-149.
158. Алексеева С. В., Коваленко Л. П., Галлерова А. В., Гудашева Т. А., Дурнев А. Д.. Экспериментальное исследование противовоспалительных свойств ноопепта и его влияние на уровень цитокинов// *Экспериментальная и клиническая фармакология* – 2012- том 75 № 9 - с. 25 – 2.
159. Андреева Н.А., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Островская Р.У., Гудашева Т.А, Викторов И.В. Нейропротективные эффекты ноотропного дипептида ГВС-111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидативном стрессе *in vitro*// *Бюллетень экспериментальной биологии и клинической медицины* – 2000- том. 130 №10 - с. 418-421.

160. Баласаян М. Г. Изучение роли оксида азота в механизмах нейропротекторного и анксиолитического действия афобазола в сравнительном аспекте// Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук, Ереван - 2003- стр. 74-75.
161. Баласаян М.Г., Ерицян Э.Л., Топчян А.В., Карамян С.Т., Галоян А.А. Цереброваскулярные эффекты обогащенного пролином полипептида// Нейрохимия – 2012 - том 29 №3 - с.200-205.
162. Бельник А.П., Островская Р.У., Полетаева И.И. Дипептидный препарат ноопепт устраняет вызванный скополамином дефицит пространственной памяти у мышей BALB/c// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2007 – том 143 №4 – с. 407-410.
163. Бессалова Е.Ю. Методика исследования поведения крыс в условиях “открытое поле”// Нейронауки: теоретические и клинические аспекты – 2011- том 7 № 1-2
164. Бобкова Н.В., Грудень М.А., Самохин А.Н., Медвинская Н.И., Елистратова Е.И., Morigova-Roch L., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Ноопепт улучшает пространственную память и стимулирует образование антител к префибриллярной структуре β-амилоида<sub>(25-35)</sub> у мышей// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2005 - том 68 №5 - с. 11-15.
165. Бойко С. С., Коротков С. А., Жердев В. П., Гудашева Т. А., Островская Р. У., Воронина Т. А.. Межвидовые различия фармакокинетики ноопепта// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2004 - том 67 № 1 - с. 40-43.
166. Бойко С.С., Островская Р.У., Жердев В.П., Коротков С.А., Гудашева Т.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Фармакокинетика и проницаемость через гематоэнцефалический барьер нового ацилпролилдипептида с ноотропными свойствами после перорального введения// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2000 - том 129 № 4 – с. 426-429.
167. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения// перв. с англ. Живописцева Е.Н., Москва “Высшая школа” – 1991 – с.399.
168. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Ноотропные препараты, достижения и новые проблемы Экспериментальная и клиническая фармакология – 1998 – том 61 №3 – с. 3-9.
169. Гаврилова С.А., Ус К.С., Островская Р.У., Кошелев В.Б. Нейропротекторный эффект пролинсодержащего дипептида ноопепта на модели мозгового инсульта, вызванного дистальной перевязкой средней мозговой артерии// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2006 - том 69 №4 - с. 16-18.
170. Горбачев С.В., Беленичев И.Ф., Дунаев В.В., Бухтиярова Н.В. Фармакологическая коррекция повреждений нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры в условиях

экспериментального нарушения мозгового кровообращения// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2007 – том 70 №6 – с. 13-16.

171. Гудашева Т. А., Сколдинов А. П. Стратегия создания дипептидных нейрорепродуктивных лекарственных препаратов. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003 – том. 66 №2 – с. 15-19.

172. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропного дипептида циклопролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2001- том №5 - с. 547-550.

173. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга// Москва, Медицина – 2001 -328с.

174. Демченко В.В., Артемьев В.Н. Гистологическая техника. Омская медицинская академия –2006 г.

175. Калинина Т.С. Исследование дифференцировочных свойств циклопролил-глицина в условиях оперантного поведения у крыс// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2007 - том 70 №2 - с. 12-15.

176. Клименко Л.Л.. Структурно-функциональная организация межполушарной асимметрии: экспериментальные и клинические аспекты проблемы// Москва: Институт химической физики РАН – 2008 – с.92

177. Ковалев Г.И., Воробьев В.В. Роль неNMDA глутаматных рецепторов в ЭЭГ-эффектах хронического применения ноопепта ГВС-111 у ненаркотизированных крыс// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2002 – том. 65 №6 – с. 6-9.

178. Коваленко Л. П., Мирамедова М. Г., Алексеева С. В., Гудашева Т. А., Островская Р. У., Середенин С. Б. Противовоспалительные свойства ноопепта (дипептидного ноотропа гвс-111)// Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002 – том. 65 №2 – с. 53-55

179. Колясникова К. Н., Гудашева Т. А., Назарова Г. А., Антипов П. И., Николаев С. В., Антипова Т.А., Воронина Т. А., Середенин С. Б.. Сходство цикло-пролилглицина с пирацетамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2012- том 75 № 9 - с. 3–6.

180. Кравченко Е.В., Понтелеева И.В., Трофимов С.С., Лапа В.И., Островская Р.У., Воронина Т.А. Оригинальный ноотропный и нейропротекторный препарат ноопет усиливает противосудорожную активность вальпроата у мышей// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2009 - том 72 №6 - с. 15-17.

181. Лапин И.П. Модели тревоги на мышах: оценка в эксперименте и критика методики// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2000 – том 63 № 3 – с. 58-62.

182. Луньшина Е.В., Ганьшина Т.С., Мирзоян Р.С. Цереброваскулярные эффекты композиции, содержащей пироглутаминовую кислоту и пирролидон// Сборник статей - Методология флюометрии – 2001– выпуск 5 – с. 143-151.
183. Луценко В.К., Вуколова М.Н., Гудашева Т.А. Циклопролилглицин и пролинсодержащий препарат ноопепт вызывают два вида ответов мембранного потенциала синаптонейросом// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2003 – том. 135 №6 –с. 656-659.
184. Лысенко А.В., Ускова Н.И., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А. Дипептидный ноотроп ГВС-111 предотвращает накопление продуктов перекисного окисления липидов при иммобилизации// Экспериментальная и клиническая фармакология – 1997 – том. 60 №5 – с. 15-18.
185. Мельникова Е.В.. Многофакторная нейропротекция при острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения// Автореферат диссертации.- 2007-с.
186. Молодавкин Г.М., Борликова Г. Г., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Тушмалова Н.А., Середенин С.Б. Влияние нового дипептидного ноотропа ноопепта и его метаболита цикло-L-пролилглицина на транскаллозальный вызванный потенциал мозга крыс// Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002 – том. 65 №2 – с. 3-5.
187. Островская Р.У. Эволюция проблемы нейропротекции// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2003 – том 66 №2 – с. 32-37.
188. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Бойко С.С., Жердев В.П., Коротков С.А., Кравцова О.Ю. Биодоступность ноопепта — нового ноотропного препарата дипептидной структуры// Химико-фармацевтический журнал - 2004 - том № 12 - с.3-5.
189. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Бойко С.С., Жердев В.П., Коротков С.А. Фармакокинетика нового потенциального дипептидного ноотропного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс// Химико-фармацевтический журнал – 2001- том № 9 - с.11-13.
190. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б, Трофимов С.С., Морозова А.А., Никитин С.В. [Создание ноотропных дипептидов с использованием эволюционно-генетического подхода](#)// Химико-фармацевтический журнал – 2006 – том №1- с. 18-22.
191. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б.. Оригинальный ноотропный и нейропротективный препарат ноопепт// Экспериментальная и клиническая фармакология – 2002 - том 65 №5 - с. 66-72.
192. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Лысенко А.В., Менджерицкий А.М., Прокофьев В.Н., Демьяненко С.В. Процессы перекисного окисления липидов в коре больших полушарий

головного мозга и плазме крови молодых крыс с высоким уровнем тревожности при эмоциональном стрессе: защитный эффект ноотропного дипептида ГВС-111// *Нейрохимия – 2003- том №4 - с. 281-286.*

193. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Трофимов С.С., Греченко Т.Н., Фирова Ф.А., Баркова Е.Б., Гутырчик Е.Ф., Мирзоев Т.Х. Поведенческий и электрофизиологический анализ холино-позитивного действия ноотропного ацил-пролин дипептида (ГВС-111)// *Экспериментальная и клиническая фармакология – 2001- том 64 №2 – с. 11-14.*

194. Островская Р.У., Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Мирзоев Т.Х., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Многокомпонентный антитромботический эффект нейропротективного пролил содержащего дипептида ГВС-111 и его основного метаболита цикло-L-пролилглицина// *Экспериментальная и клиническая фармакология – 2002 - том 65 № 2- с. 34-37.*

195. Островская Р.У., Мирзоев Т.Х., Романова Г.А., Гудашева Т.А., Кравченко Е.В., Трофимов С.С., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Пролинсодержащий дипептид ГВС-111 сохраняет ноотропную активность при пероральном введении// *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2001 - том №10 - с. 404-408.*

196. Островская Р.У., Цаплина А.П., Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С. Эффективность ноотропного и нейропротекторного дипептида ноопепта на стрептозоциновой модели болезни Альцгеймера у крыс// *Экспериментальная и клиническая фармакология – 2010 - том 73 №1 - с. 2-6.*

197. Подопригора Г.И., Нарциссов Я.Р., Александров П.Н. Влияние глицина на микроциркуляцию в пиальных сосудах головного мозга крыс// *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2005 – том 139 №6 –с. 642-644.*

198. Романова Г.А., Мирзоев Д.Х., Барсков И.В., Викторов И.В., Гудашева Т.А. Островская Р.У. Антиамнестическое действие ацил-пролилсодержащего дипептида (ГВС-111) на модели дозированного компрессионного повреждения лобной коры// *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2000 - том 63 № 9 - с. 272-274.*

199. Романова Г.А., Шакова Ф.М. Дизрегуляция когнитивных функций при локальной ишемии префронтальной коры головного мозга крыс// *Нейронауки – 2006 – том 3 № 5 - с.10-16.*

200. Рябчикова Н.А., Тушмалова Н.А., Прагина Л.Л., Шульговский В.В. Влияние пирacetама на условнорефлекторную память крыс в условиях вероятностного подкрепления// *Экспериментальная и клиническая фармакология – 2001 – том 64 № 6 – с. 17-19.*

201. Саркисов К.Г., Дужак Г.В. Лазерная доплеровская флоуметрия как метод оценки состояния кровотока в микрососудах// Сборник статей - Методология флоуметрии – 1999 – выпуск 3 – с. 9-15.
202. Середенин С.Б, Гудашева Т.А., Бойко С.С., Ковалев Г.И., Воронин М.В., Яркова М.А. Эндогенный дипептид циклопролилглицин проявляет селективную анксиолитическую активность у животных с выраженной реакцией страха// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2002 – том №4 - с.417-419.
203. Топчян А.В. Лазерный доплеровский флоуриметр и изучение фармакологических воздействий на микроциркуляцию коры головного мозга крыс// Методология флоуметрии – 1997 - вып. 4 – с. 129-136.
204. Топчян А.В. Фармакологическая коррекция кровоснабжения и функционального состояния мозга при его локальном ишемическом поражении// Автореф.дис.доктора мед.наук. Москва. - 1998 – с. 47.
205. Фисенко В. П. (председатель), Арзамасцев Е. В., Бабаян Э. А., Булаев В.М. (ответственный секретарь), Герасимов В.Б., Глушков Р.Г. и соавт. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ// Москва: ИИА Ремедиум - 2000 - с.398.
206. Чилингарян А.Н. Кальций-аденозинтрифосфатный метод и перспективы безынъекционного выявления интраорганного микроциркуляторного русла// Журнал экспериментальной и клинической медицины – 1977 - №5 – с.19-28.
207. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Стеценко В.П., Марков С.В., Войков И.В., Саблина Г.В. и соавт. Влияние кортиколиберина и белков теплового шока 70 кДа, вводимых в раннем постнатальном периоде, на поведенческие эффекты ноопепта и дилепта у половозрелых крыс// Нейропсихофармакология –2006 – том 5 №7 –с. 4-9.