

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ,  
БИОТЕХНОЛОГИИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ**

**На правах рукописи**

**ДЕВЯТОВ АЛЕКСАНДР АНДРЕЕВИЧ**

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ  
ВЕЩЕСТВ ПИЩИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО  
ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

**Специальность 03.01.04 - «Биохимия»**

**Диссертация**

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Научный руководитель: доктор медицинских наук  
профессор  
академик РАН Тутельян В.А**

**Москва - 2019**

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1. ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>4</b>
<b>2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Ишемический инсульт головного мозга: этиология и патогенез .</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Механизмы развития ишемического повреждения головного мозга.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3. Современные и перспективные подходы к терапии ишемического инсульта .....</b>	<b>26</b>
2.3.1. Основные направления терапии при ишемическом инсульте ...	26
2.3.2. Антиоксиданты как потенциальные нейропротекторы при ишемическом инсульте .....	27
2.3.2.1. Карнозин .....	27
2.3.2.2. Флавоноиды.....	30
<b>2.4. Способы моделирования ишемического инсульта головного мозга в экспериментальных исследованиях.....</b>	<b>37</b>
<b>3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Содержание животных и состав рационов .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Дизайны экспериментов.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3. Модели фокальной ишемии головного мозга .....</b>	<b>45</b>
<b>3.4. Оценка площади некротического очага .....</b>	<b>48</b>
<b>3.5. Отбор проб для биохимических исследований и приготовление гомогенатов ткани мозга .....</b>	<b>48</b>
<b>3.6. Биохимические методы исследования .....</b>	<b>50</b>
<b>3.7. Методы статистической обработки .....</b>	<b>58</b>
<b>4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1. Изучение влияния биологически активных веществ пищи на размер некротического очага при фокальной ишемии головного мозга.....</b>	<b>59</b>
4.1.1. Изучение влияния карнозина, кверцетина и гесперетина на размер некротического очага при фокальной ишемии-реперфузии мозга.....	59
4.1.2. Изучение влияния карнозина на размер некротического очага при необратимой фокальной ишемии мозга .....	60
<b>4.2. Изучение действия биологически активных веществ пищи на биохимические показатели в крови и ткани мозга при фокальной ишемии мозга.....</b>	<b>60</b>

4.2.1. Исследование действия карнозина на показатели окислительного стресса и воспаления при фокальной ишемии-реперфузии мозга .....	60
4.2.2. Исследование действия кверцетина и гесперетина на показатели окислительного стресса и воспаления при фокальной ишемии-реперфузии	67
4.2.3. Исследование действия карнозина и гесперетина на показатели окислительного стресса в приочаговой зоне коры мозга при фокальной ишемии-реперфузии .....	75
4.2.4. Исследование действия карнозина на показатели окислительного стресса и апоптоза при необратимой фокальной ишемии.....	78
<b>5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	90
<b>6. ВЫВОДЫ</b> .....	102
<b>7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	103
<b>8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	105

# 1. ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность темы

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущими причинами смерти и инвалидизации населения в мире. Нарушения мозгового кровообращения занимают второе место в мире по количеству смертей, уступая только инфаркту миокарда [21].

Терапия ишемического инсульта разделяется на два основных направления: восстановление кровотока (реперфузия) и нейропротекция [31]. При этом, несмотря на масштаб проблемы, доказанную терапевтическую эффективность в острой фазе ишемического инсульта показали только методы, направленные на реперфузию мозга: тромболитическая терапия и удаление эмбола хирургическим путём. Однако только 5-13% пациентов подходит под критерии для применения данных видов лечения [230]. Что касается нейропротекции, то несмотря на многочисленные экспериментальные данные, демонстрирующие эффективное действие различных фармакологических агентов на моделях ишемии головного мозга, в неврологической практике нет ни одного препарата с клинически доказанным нейропротекторным эффектом [165]. В связи с этим, актуальным является поиск и разработка новых методов терапии и профилактики ишемического инсульта [20].

Одним из ключевых молекулярных механизмов, приводящих к гибели нейронов при ишемии головного мозга является окислительный стресс (ОС) [224]. Патогенетическая значимость ОС свидетельствует о целесообразности применения препаратов антиоксидантного действия в условиях ишемии мозга, в том числе природных антиоксидантов, входящих в состав пищевых продуктов [60]. К таким веществам можно отнести флавоноиды гесперетин и кверцетин, а также эндогенный дипептид карнозин.

Гесперетин встречается в плодах и соках цитрусовых [93]. Для гесперетина были показаны антиоксидантные, противовоспалительные, антиканцерогенные и противоаллергические эффекты [100, 210]. Нейропротекторное действие гесперетина было показано в условиях глобальной ишемии мозга у крыс [101], а

также на клеточной модели ОС, индуцированной  $H_2O_2$  в культуре клеток PC12 [131]. Кверцетин встречается в овощах, фруктах, орехах и зерновых. В литературе описан широкий спектр биологических эффектов кверцетина, в том числе антиоксидантные, нейропротекторные, противовирусные, антиканцерогенные, антибактериальные, противовоспалительные и гепатопротекторные [227]. В опухолевых клетках специфически проявляется проапоптотический эффект кверцетина, что делает возможным его применение в качестве адъювантного препарата в составе комплексной химиотерапии онкологических заболеваний [40]. Нейропротекторное действие кверцетина было показано при его внутривенном введении на моделях глобальной ишемии у крыс [208], а также фокальной ишемии, индуцированной фототромбозом [154]. Карнозин в больших количествах встречается в говядине, свинине, мясе домашней птицы и рыбе [103]. Карнозин является природным гидрофильным антиоксидантом прямого действия [52]. Также существуют данные о том, что карнозин выступает в организме в качестве иммуномодулятора [16]. Кроме того, карнозин препятствует развитию глиобластомы у мышей, снижая экспрессию транскрипционных факторов NF-1 и NF-кВ [43]. Карнозин уменьшает неврологические нарушения, снижает летальность и улучшает функциональный исход после глобальной ишемии у песчанок, крыс и мышей, и транзиторной ишемии у крыс [82]. При этом в большинстве исследований использованы высокие дозы карнозина [46, 178, 197] и лучшие результаты получены при его введении за 15-30 мин до окклюзии магистральных артерий мозга. В то же время литературные данные об эффективности карнозина, кверцетина и гесперетина, применяемых при фокальной ишемии головного мозга у экспериментальных животных немногочисленны, и не всегда согласуются друг с другом. Остается малоизученным вопрос об эффективности данных соединений в условиях временной фокальной ишемии головного мозга при их длительном профилактическом применении. Работы по изучению влияния данных веществ, в качестве компонентов пищевого рациона, в экспериментальных моделях ишемического инсульта в литературе отсутствуют.

Исходя из вышеизложенного, **целью настоящего исследования** является изучение влияния природных биологически активных минорных компонентов пищи кверцетина, гесперетина, а также карнозина на процессы ишемического повреждения мозга на моделях фокальной ишемии у крыс.

**Задачи исследования включают:**

1. Исследовать активацию проапоптотических сигналов, регистрируемую по уровню белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2, активности протеинкиназы В (Akt) и MAP киназ, а также уровень липидных гидроперекисей и общей антиоксидантной активности в различных зонах коры головного мозга и плазме крови крыс с необратимой 24 ч фокальной ишемией мозга.
2. Оценить состояние окислительного статуса, регистрируемого по уровню активности ферментов антиоксидантной защиты, общей антиоксидантной активности, а также продуктам окислительного повреждения липидов и белков, в ткани мозга и плазме крови крыс с 24 ч фокальной ишемией/реперфузией.
3. Изучить влияние кверцетина, гесперетина и карнозина на площадь ишемического очага при их включении в состав рациона в течение 7 дней перед 24 ч фокальной ишемией/реперфузией головного мозга в бассейне средней мозговой артерии у крыс.
4. Оценить возможное дозозависимое нейропротекторное действие карнозина при его внутрибрюшинном введении в постишемический период в условиях необратимой 72 ч фокальной ишемии мозга у крыс.
5. Изучить влияние карнозина на содержание продуктов окислительного повреждения липидов, а также на уровень белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2 и активность протеинкиназы В (Akt) и MAP киназ в мозге крыс, перенесших 24 ч необратимую фокальную ишемию мозга.
6. Исследовать действие кверцетина, гесперетина и карнозина на показатели окислительного статуса и воспалительных процессов в ткани мозга и плазме крови при их включении в состав рациона в течение 7 дней перед 24 ч фокальной ишемией/реперфузией головного мозга у крыс.

### **Степень разработанности проблемы**

На сегодняшний день, в неврологической практике отсутствуют препараты с клинически доказанным нейропротекторным эффектом [165]. В качестве потенциальных нейропротекторов при инсульте в литературе рассматриваются различные минорные компоненты пищи [72]. В частности внутрибрюшинное введение флавонола растительного происхождения кверцетина, при необратимой фокальной ишемии значительно сдерживает рост активности матриксных металлопротеиназ, снижает развивающийся отек мозга и улучшает неврологическую симптоматику [154]. Дипептид карнозин, содержащийся в мясе, при введении крысам *per os* в течение 26 дней перед моделированием глобальной ишемии уменьшает содержание лактата в мозге по сравнению с контрольными животными [86]. На модели глобальной ишемии-реперфузии головного мозга крыс карнозин при его профилактическом введении животным (в дозе 150 мг/кг) снижает смертность животных, а так же улучшает обучение поиска пищи в T-образном лабиринте по сравнению с контролем [211]. Гесперетин из группы флаванолов на модели глобальной церебральной ишемии-реперфузии у крыс улучшает способность к обучению после перенесенной ишемии головного мозга, а также улучшает гистологическую картину, снижая процент разбухших из-за отека нейронов и препятствуя разрушению клеточных мембран [101]. Также гесперетин в эксперименте *in vitro* защищает клетки нервного гребня РС-12 от цитотоксического действия  $H_2O_2$  [131]. При этом, в литературе нет данных о нейропротекторном действии кверцетина, карнозина и гесперетина, рассматриваемых в качестве компонентов пищевого рациона, как на экспериментальных моделях ишемического инсульта, так и в рамках клинических исследований.

### **Научная новизна работы**

В данном исследовании впервые показано прямое нейропротекторное действие карнозина в низких дозах (от 50 до 150 мг/кг м.т. в сут.) как при профилактическом, так и при терапевтическом введении, проявившееся в

снижении площади очага некроза. Защитный эффект карнозина продемонстрирован в условиях 72 ч необратимой фокальной ишемии и в условиях ишемии/реперфузии мозга у крыс. Нейропротекторный эффект карнозина при ишемии реализуется через снижение окислительного стресса, а также ингибирование сигнальных путей апоптоза. Для гесперетина также показано прямое нейропротекторное действие при профилактическом введении в условиях ишемии/реперфузии мозга у крыс. Нейропротекторное действие гесперетина, аналогично карнозину, при ишемии/реперфузии реализуется через снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и восстановление антиоксидантной активности ткани мозга. Вместе с тем, гесперетин сильнее, чем карнозин, влияет на активность супероксиддисмутазы в мозге.

Впервые показано, что кора головного мозга в норме гетерогенна по показателям окислительного статуса. Показано, что нарушение окислительного статуса мозга через сутки после начала ишемии как при ишемии/реперфузии, так и при постоянной ишемии не распространяется за пределы ишемизированного полушария, тогда как изменения профиля белков апоптоза затрагивают ткань обоих полушарий. Кроме того, выявлено, что в ишемизированном полушарии при ишемии с реперфузией окислительный статус относительно контроля изменяется по-разному в целом полушарии и в приочаговой зоне коры мозга.

### **Практическая значимость работы**

В рамках работы разработана инновационная система оценки эффективности минорных компонентов пищи, которая может быть использована для доклинических испытаний веществ, употребляемых в пищу как для профилактики ишемических сосудистых заболеваний головного мозга, так и уменьшения негативных последствий ишемического инсульта или нарушения мозгового кровообращения.

По результатам экспериментальных исследований были составлены методические рекомендации по обогащению рационов карнозином и



гесперетином для профилактики ишемического инсульта и реабилитации больных.

Кроме того, получены новые фундаментальные данные о состоянии оксидативного статуса разных отделов головного мозга в норме и при фокальной ишемии. В частности, данные о неоднородном состоянии оксидативного статуса в коре мозга позволяют более корректно отбирать пробы мозга при изучении фокальной ишемии, а также интерпретировать результаты исследований. Выявленная зависимость направления изменения активности антиоксидантных ферментов и продуктов ПОЛ в ткани мозга от удалённости ишемического очага позволяет объяснить причины противоречий, касающихся изменений данных показателей в работах, посвящённых исследованию окислительного стресса при ишемии.

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

1. Лобные доли коры головного мозга у крыс характеризуются более высоким уровнем липидных гидроперекисей и общей антиоксидантной активности относительно других отделов коры.
2. Существенное нарушение окислительного статуса мозга через сутки после начала ишемии ограничено ишемизированным полушарием, тогда как изменения профиля белков апоптоза затрагивают оба полушария. Изменения окислительного статуса мозга при ишемии с реперфузией различаются в целом ишемизированном полушарии и в изолированной приочаговой зоне коры мозга.
3. Карнозин обладает нейропротекторным действием в низких дозах при фокальной ишемии, за счет предотвращения роста липидных гидроперекисей и дозозависимого восстановления общей антиоксидантной активности, а также ингибирования апоптоза.
4. Гесперетин при профилактическом введении с рационом демонстрирует нейропротекторное действие при ишемии с реперфузией, за счёт предотвращения образования продуктов перекисного окисления липидов,

повышения антиоксидантной активности ткани мозга, а также повышения активности супероксиддисмутазы в мозге.

5. Кверцетин при профилактическом введении с рационом не оказывает нейропротекторного действия, а также не влияет на показатели окислительного статуса и воспалительных процессов в ткани мозга при ишемии с реперфузией.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на первой и второй Всероссийской конференциях с международным участием «Фундаментальные и прикладные проблемы нейронаук: функциональная асимметрия, нейропластичность, нейродегенерация» (Москва, 2014, 2016), V съезде физиологов СНГ и биохимиков России, конференции ADFLIM. Сочи-Дагомыс, 04-08 октября 2016 г., XVI и XVII всероссийских конгрессах нутрициологов и диетологов с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии» (Москва, 2016, 2018), Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи» с международным участием, Москва, 12-13 октября 2017).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 7 статей в научных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, среди которых 6 статей, входят в базу Web of Science (WOS) и 5 статей входят в базу Scopus

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, включает 26 таблиц и иллюстрирована 34 рисунками. Указатель литературы включает 234 источника, из которых 31 отечественный и 203 зарубежных.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Ишемический инсульт головного мозга: этиология и патогенез

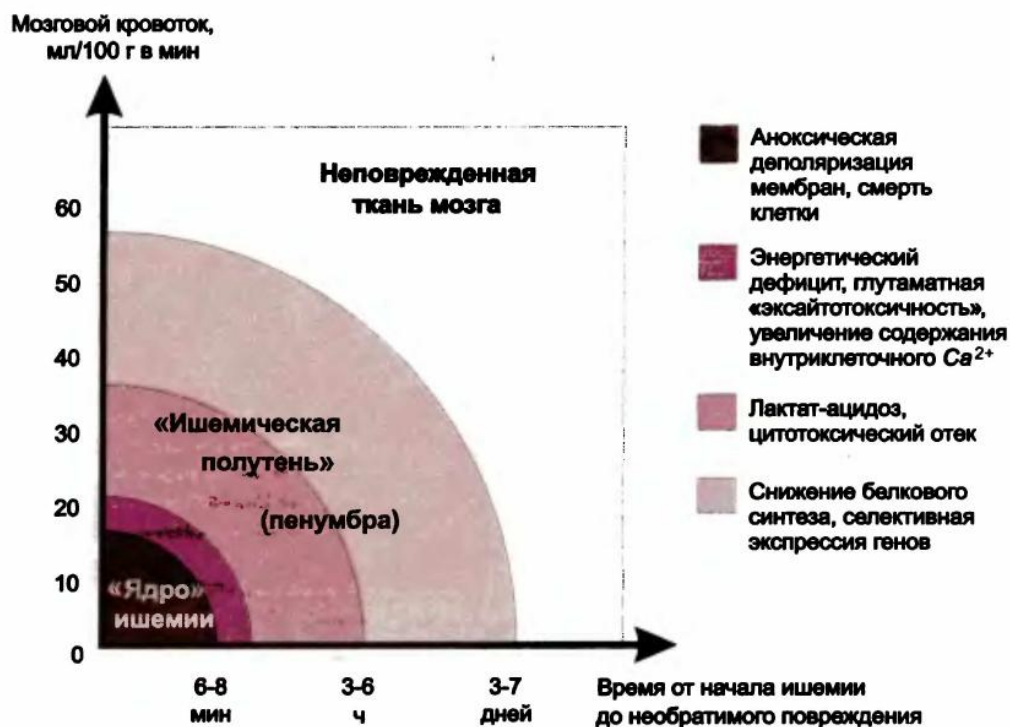
Для нормального функционирования головного мозга необходимо постоянное обеспечение его глюкозой и кислородом, которые поступают из крови. Хотя масса головного мозга составляет не более 1-2% всей массы тела, в покое на его долю приходится 15% сердечного выброса, 20-25% поступающего в организм кислорода и до 70% свободной глюкозы [9]. Мозговой кровоток поддерживается на постоянном уровне, несмотря на изменения внутричерепного и артериального давления, благодаря способности сосудов к ауторегуляции. Так как в головном мозге очень интенсивно происходят аэробные процессы, лимитирующим для обеспечения жизнедеятельности является уровень кислорода, а не энергетических субстратов, например, глюкозы [151]. Возможны несколько причин из-за которых происходит недостаточное поступление кислорода в головной мозг: гипоксия, связанная со снижением парциального давления кислорода в крови; нарушение способности крови к переносу кислорода; ингибирование процессов окислительного фосфорилирования в ткани мозга; ишемия (временная или постоянная) вследствие нарушения кровообращения. Прекращение кровотока может быть результатом снижения перфузии (при артериальной гипотензии) или обструкции сосудов, питающих головной мозг [9, 31].

Экспериментально установлена последовательность метаболических реакций ткани мозга на снижение кровотока (рисунок. 2.1). В норме величина мозгового кровотока составляет около 50 мл/(100 г ткани/мин) [62]. При падении кровотока до 70-80% от нормы в нейронах снижается уровень синтеза белка [122]. Снижение кровотока до 35 мл/(100 г ткани/мин) сопровождается увеличением концентрации лактата и, как следствие, развитием лактат-ацидоза и тканевого отёка [44]. Падение кровотока до 20 мл/100 г в 1 мин приводит к снижению синтеза АТФ, формированию энергетической недостаточности и как следствие к дестабилизации клеточных мембран и избыточному выбросу возбуждающих

нейротрансмиттеров (эксайтотоксичности) [123]. Прекращение электрической активности в мозговой ткани наступает при падении скорости кровотока до 16-18 мл/(100 г ткани/мин). Ионные насосы в нейроне при этом функционируют и нейрон остаётся жизнеспособным, пока скорость кровотока не упадёт ниже 10-12 мл/(100 г ткани/мин) [62].

Для обозначения зоны необратимого повреждения используют термин «ядро инфаркта», для обозначения зоны ишемического поражения обратимого характера (рисунок 2.1) – термин «ишемическая полутень» (пенумбра) [45]. С течением времени ткань в зоне полутени либо восстанавливает свою функциональную активность, либо некротизируется. В связи с этим, одним из приоритетных направлений терапии ишемического инсульта является предупреждение смерти нейронов в области ишемической полутени или пенумбры. Временной период, в течение которого с наибольшей эффективностью могут проводиться лечебные мероприятия, называется терапевтическим окном, и составляет 4 - 6 часов после начала симптомов заболевания [8, 192].

Восстановление нормального кровотока или реперфузия в зоне ишемии является ключевым событием для предотвращения необратимых повреждений в мозговой ткани. Если восстановление кровотока произошло немедленно после окклюзии артерии, функционирование нейронов в ишемическом очаге и зоне полутени полностью восстанавливается. В частности, при терапии инсульта успешно применяется тканевой активатор плазминогена (tPA). При условии введения препарата в пределах терапевтического окна, т.е. в течение первых 4 часов с момента начала симптомов, tPA увеличивает вероятность улучшения состояния пациента. Кроме того, восстановление кровотока может быть осуществлено путем механического удаления эмбола при помощи эндоваскулярного зонда. Терапевтическое окно для такой операции больше, чем для терапии tPA, и составляет 6 часов. Однако перед операцией пациенту также должен быть введен tPA, чтобы избежать образования тромбов, вызванного самой операцией [189].



**Рисунок 2.1** – Формирование инфаркта мозга на фоне снижения церебрального кровотока [9]

Тем не менее, если реперфузии предшествовала даже умеренная ишемия, в очаге может наблюдаться избирательная гибель нейронов [99]. Кроме того, если возобновление кровотока произошло позже, чем через 2 минуты после его прерывания, возникают поэтапные нарушения кровоснабжения. На первом этапе возникает постишемическая гиперемия, обусловленная усиленным кровотоком через коллатерали закупоренной артерии, высвобождением вазоактивных и провоспалительных метаболитов [214]. На втором этапе кровоток в ткани падает ниже доишемического уровня («невосстановленный кровоток») [39]. Причинами данного явления также являются отсроченные метаболические нарушения в ишемизированной ткани, такие как сдавление капилляров мозга отёчными астроцитами, образование отёчного сосудистого эндотелия, образование эндотелиальных микроворсинок, повышение внутричерепного давления, а также гипотензия, развивающаяся после ишемии [121]. Важным фактором, отягчающим нарушения кровоснабжения, является вазомоторный паралич сосудов, вследствие

которого снижается зависимость кровотока от метаболических потребностей ткани. В результате функциональная активация мозга не сопровождается адекватным нарастанием кровотока [152].

Реперфузия, проводимая по истечении времени терапевтического окна, может иметь негативные последствия – такие как мозговой отёк, вызванный снижением эффективности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и геморрагический инсульт [180]. В работе [134] на крысах с окклюзией левой общей сонной артерии показано, что реперфузия менее чем через 1 час после прекращения кровотока значительно снижает степень отёка мозга по сравнению с животными без реперфузии. Восстановление кровотока более чем через 3 часа после начала окклюзии наоборот значительно усугубляет отёк. В работе [175] на крысах с окклюзией средней мозговой артерии (СМА) продемонстрировано, что реперфузия через 2 часа после ишемии почти полностью предотвращает гибель нейронов в области полутени.

Вследствие кратковременной ишемии может возникать так называемая отставленная гибель нейронов, о которой впервые было сообщено в исследовании [143]. При этом наблюдается селективная дегенерация некоторых популяций нейронов, в том числе пирамидальных клеток гиппокампа, нейронов неокортекса и клеток Пуркинье.

## 2.2. Механизмы развития ишемического повреждения головного мозга

На рисунке 2.2 представлена схема основных путей патохимического каскада при ишемии.

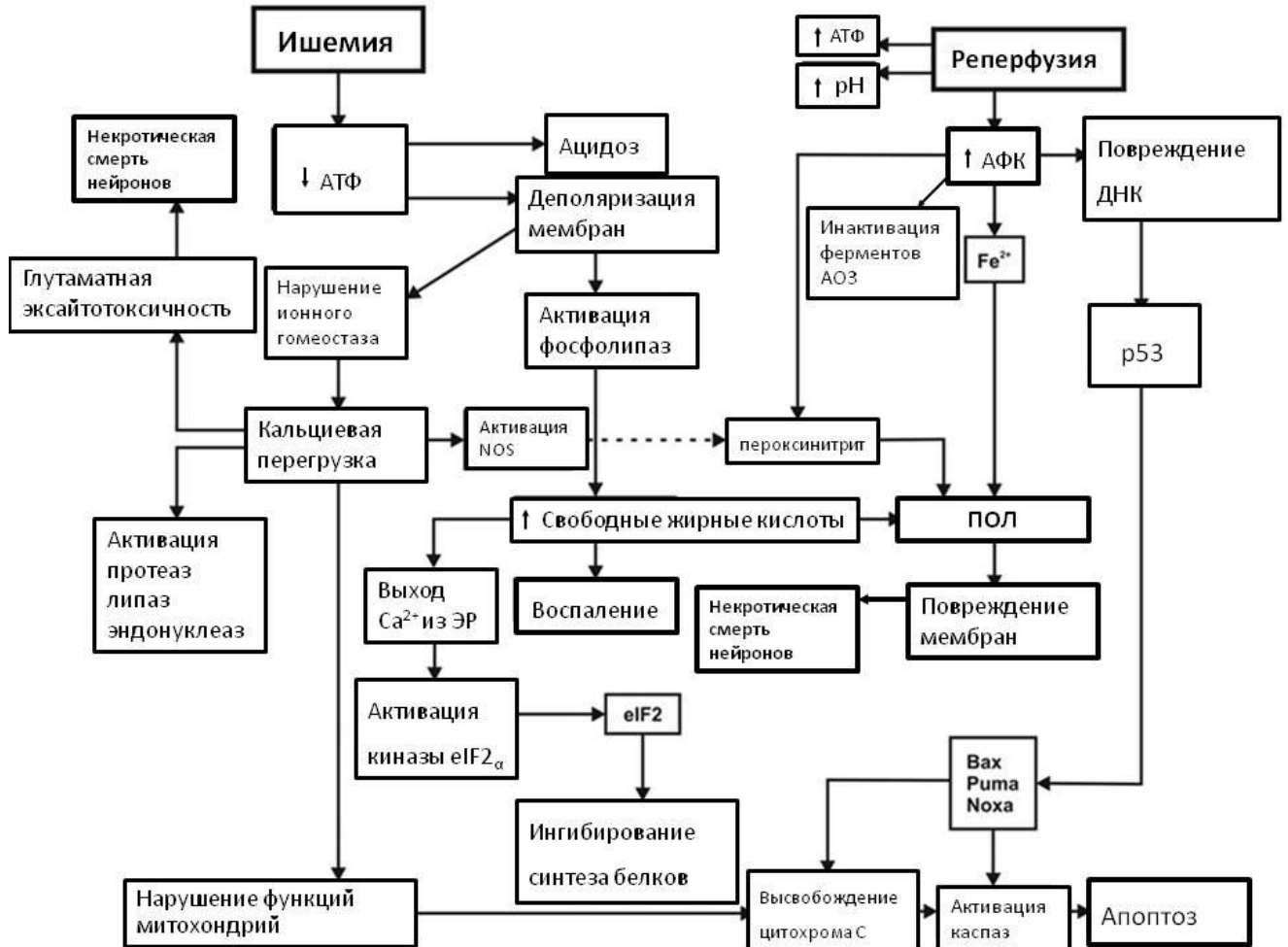


Рисунок 2. 2 – схема основных путей патохимического каскада при ишемии [75]

### 2.2.1. Окислительный стресс

Окислительный стресс (ОС), возникающий в результате избыточной продукции активных форм кислорода (АФК), играет важную роль в развитии клеточного повреждения при ишемии головного мозга. Продукция АФК начинает расти уже на стадии окклюзии. При этом она резко увеличивается при полном или частичном восстановлении кровотока [202]. К АФК относят супероксид-радикал ( $O_2^-$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $\cdot OH$ ), пероксинитритный анион ( $ONOO^-$ ) и др. Механизмы повреждающего действия АФК на клетки

включают в себя перекисное окисление липидов (ПОЛ) клеточных мембран, денатурацию белков, инактивацию ферментов, повреждение ДНК, повреждение цитоскелета, а также активацию сигнальных путей апоптоза [38]. Существует несколько причин, высокой подверженности головного мозга окислительному повреждению: высокий уровень потребления кислорода, высокая концентрация полиненасыщенных жирных кислот, которые могут быть подвержены перекисному окислению липидов, относительно низкий уровень эндогенных антиоксидантов, а также большое количество ионов железа, которые играют прооксидантную роль во время развития окислительного стресса [201]. Первичный источник АФК в головном мозге – это электронтранспортная цепь (ЭТЦ) митохондрий, NADPH-оксидазы и ксантинооксидаза. При нормальных физиологических условиях, большинство электронов, поступающих в ЭТЦ, проходят всю цепь и идут на восстановление кислорода до воды. Небольшая часть электронов, вследствие утечки из ЭТЦ, реагирует с кислородом, образуя супероксид-радикал. В норме, этот радикал и другие АФК быстро нейтрализуются эндогенными антиоксидантными системами. Однако при патологических условиях, в частности при ишемии, эти системы оказываются истощены или выведены из строя, из-за чего процесс генерации АФК выходит из под контроля [202]. Важную роль в процессе генерации АФК играют ионы кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), поступающие при ишемии внутрь митохондрий, и достигающие там патологических концентраций [193]. Накопление кальция является мощным сигналом для активации митохондриальных фосфатаз [41, 118, 130]. При легкой гипоксии кальций стимулирует окислительное фосфорилирование, восполняя возникший дефицит АТФ [47]. Напротив, в условиях ишемии, активация ферментов окислительного фосфорилирования не приводит к повышенной продукции АТФ, так как ЭТЦ заблокирована ввиду отсутствия конечного акцептора электронов  $\text{O}_2$ . Вместо этого комплексы ЭТЦ оказываются гиперактивированными, но при этом не могут транспортировать электроны и поддерживать протонный градиент в митохондриях [66]. Вдобавок к этому, дефосфорилированная цитохром-с оксидаза (комплекс IV ЭТЦ) перестает



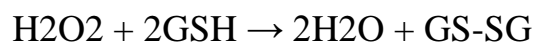
аллостерически ингибироваться АТФ [130]. С началом реперфузии комплексы ЭТЦ начинают работать с увеличенной интенсивностью, вследствие чего падает эффективность переноса электронов, и генерируется большое количество АФК. Также из-за повышенной активности комплексов ЭТЦ возникает гиперполяризация митохондрий, что является решающим фактором для генерации АФК [202].

Одним из важных последствий развития ОС при ишемии является истощение запаса эндогенных антиоксидантов в ткани мозга [138]. Интегральными показателями уровня эндогенных антиоксидантов при ишемии могут служить общая восстанавливающая активность, регистрируемая в системе FRAP [51], а также железоиндуцированная хемилюминесценция [30]. Также состояние антиоксидантной системы организма оценивается по балансу содержания продуктов, образующихся в результате свободнорадикальных процессов, и реакций, подавляющих процесс их активации под воздействием антиоксидантов. С этой целью наиболее часто измеряют содержание продуктов ПОЛ: гидроперекисей липидов, малонового диальдегида (МДА), 4-гидроксинонелала; а также активность основных ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионпероксидазы (ГП) [14, 38, 196].

Ферменты антиоксидантной защиты играют важную нейропротекторную роль при ишемическом инсульте. Показано, что СОД вносит значимый вклад в защиту нейронов от повреждения, вызванного ишемией-реперфузией, путем непосредственной нейтрализации АФК. Так, в исследовании [78] по моделированию 1 ч ишемии-реперфузии, проведенном на мышах с нокаутом гена СОД1, показано, что 100% животных (8/8) с отсутствующей активностью СОД погибают в течение первых 24 часов после реперфузии, тогда как из группы животных дикого типа погибает только 11,1% (2/18). В исследовании [228] на модели 1 ч фокальной ишемии с реперфузией показано, что введение крысам СОД подавляет повышение генерации свободных радикалов, а также значительно

уменьшает размер ядра инфаркта в головном мозге через 3 часа после реперфузии.

Глутатионпероксидаза (ГП) – фермент, функцией которого является восстановление  $H_2O_2$  до воды:



где GSH - восстановленный глутатион, GS-SG - окисленный глутатион.

Наличие нейропротекторной функции у ГП также исследовано с использованием методов генной инженерии. У трансгенных мышей с повышенной экспрессией ГП при моделировании фокальной ишемии-реперфузии показано снижение размера инфаркта на 48% по сравнению с мышами дикого типа. В данной работе также отмечено снижение активации астроцитов и микроглии и уменьшение выраженности воспаления. Размер инфаркта у мышей с нокаутом гена ГП1 после 2-часовой ишемии и 24-часовой реперфузии увеличивается на 300% [79].

Каталаза (КАТ), являясь важным ферментом антиоксидантной системы защиты, ускоряет разложение  $H_2O_2$  до воды. Профилактическое внедрение в стриатум векторов, содержащих КАТ за 14-16 часов до временной окклюзии СМА оказывает нейропротекторный эффект по сравнению с контрольной группой крыс. Однако нейропротекторный эффект не наблюдается, если вектор внедрить после начала ишемии [108].

### 2.2.2. Лактатацидоз

В нормальных аэробных условиях больше 80% АТФ в головном мозге образуется за счёт метаболизма глюкозы с участием процесса окислительного фосфорилирования [96]. При ишемии окислительное фосфорилирование глюкозы угнетается, а её метаболизм продолжает идти по пути анаэробного гликолиза, в процессе чего образуется лактат [198]. Уровень рН в головном мозге в норме колеблется от 6,8 до 7,2, а количество лактата составляет от 0,2 до 1 ммоль/кг ткани в состоянии покоя, и примерно вдвое больше в состоянии интенсивной физической нагрузки [84]. Количество лактата в ишемизированном мозге может

колебаться в пределах от 8 до 38 ммоль/кг ткани, в зависимости от уровня глюкозы в крови, причем тяжесть лактатацидоза при ишемии определяется количеством доступной глюкозы [141]. При этом, повышение уровня лактата в мозге выше уровня 18-25 ммоль/кг ткани приводит к необратимому повреждению нейронов [198].

### 2.2.3. Эксайтотоксичность

Под термином «эксайтотоксичность» понимается способность глутамата и других возбуждающих нейромедиаторов вызывать необратимые повреждения нейронов при длительной возбуждающей синаптической передаче [194]. В норме концентрация глутамата во внеклеточной жидкости мозга составляет около 0,6 мкмоль/л. Гибель нейронов начинает наблюдаться при повышении его концентрации до 2-5 мкмоль/л. При повреждении нейрона локальная концентрация глутамата в этой зоне возрастает до 10 мкмоль/л. Соответственно, эксайтотоксическое поражение нейрональной ткани в отсутствие лечения может принимать лавинообразный характер [167].

При ишемии глутамат начинает накапливаться в пресинаптической щели нейронов вследствие недостаточного количества АТФ для утилизации глутамата нейронами, а также окружающими их глиальными клетками. Накопление глутамата приводит к активации ионотропных AMPA( $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метилизоксалол-4-пропионат) и NMDA (N-метил-D-аспартат) рецепторов, через которые в нейрон начинают поступать ионы натрия и кальция и магния. Это приводит к деполяризации и патологическому возбуждению нейронов [195]. Внутри клетки ионы кальция напрямую или посредством кальмодулина активируют ряд ферментов, включая NO-синтазу, протеазы, протеин-фосфатазы, протеин-киназы и эндонуклеазы [Zhivotovsky et al., 2011]. Кроме того, кальций активирует ферменты ЭТЦ, что в условиях ишемии-реперфузии приводит к усилению окислительного стресса (см подраздел «Окислительный стресс» на стр 13). Также накопление кальция в клетке приводит к так называемому стрессу эндоплазматического ретикулума или ЭПР стрессу, в результате чего,

посредством кальпаина, активируется прокаспаса-12, локализованная в мембране ЭПР. Активированная каспаза 12 активирует эффекторные каспазы, вызывая апоптоз (см. подраздел «апоптоз» на стр. 22) [182, 229].

Учитывая, что феномен глутаматной «эксайтотоксичности» и глутамат-кальциевого каскада является одним из основных в патогенезе ишемического инсульта, существует несколько перспективных нейропротекторных подходов, направленных на ингибирование данного каскада. Одним из них является блокада NMDA рецепторов. Блокада глутаматных рецепторов на экспериментальных моделях инсульта препятствует увеличению объёмов поражения [121, 148]. В частности, антагонисты NMDA рецепторов снижают объём поражения, подавляя спонтанную деполяризацию нейронов и глии [121]. На экспериментальных моделях ишемии у ряда антагонистов NMDA рецепторов, включая лубелузол, ремацемид и селфотел обнаружено нейропротекторное действие. Тем не менее, в клинических испытаниях у этих соединений не обнаружено нейропротекторного эффекта [107]. В случае с селфотелом, испытания досрочно прекращены на III фазе клинических испытаний поскольку смертность пациентов в группе, принимавшей селфотел, оказалась выше, чем в группе пациентов, получавших плацебо [83].

Другим перспективным подходом к подавлению глутаматно-кальциевого каскада при инсульте является блокирование избыточного поступления в нейроны ионов кальция. Имеется большое число данных об успешных доклинических испытаниях эффективности блокаторов кальциевых каналов [120, 191, 234]. Начиная с 80-х годов прошлого века проведено более 20 рандомизированных плацебо-контролируемых исследований блокаторов потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа — дигидропиридинов. В неврологической клинике Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова в 1995 году впервые представлены результаты слепого клинического исследования нового производного дигидропиридина — цереброкраста [10]. Цереброкраст назначали внутривенно капельно в суточной дозе 1 мг в течение 5 дней. У группы пациентов, получавших цереброкраст,

улучшения на фоне приема препарата не отмечено. Кроме того, при исходно тяжелых формах ишемического инсульта преимущество при лечении цереброкрастом не только не установлено, а наоборот, наблюдается ухудшение клинического исхода инсульта. Наиболее изученным производным дигидропиридинов является нимодипин – жирорастворимый и хорошо проникающий через ГЭБ препарат. Первые исследования на пациентах, перенесших ишемический инсульт дали обнадеживающие результаты при приеме оральной и внутривенной форм нимодипина [112]. Но последующие за этим масштабные клинические исследования, в которых нимодипин назначали перорально в первые 6 часов после появления неврологической симптоматики и внутривенно в первые 12 часов, соответственно, продемонстрировали отсутствие значимого положительного действия препарата на клинический исход ишемического инсульта [4, 119].

#### 2.2.4. Воспаление

Воспаление является одним из ключевых механизмов повреждения ткани мозга при ишемическом инсульте. В то же время воспалительные процессы играют значительную роль в процессе репарации нервной ткани после перенесенного инсульта, включая удаление мёртвой ткани и формирование глиального рубца. Отдельные компоненты воспалительного каскада могут оказывать нейропротекторное действие в зависимости от изначального состояния ткани, выраженности каскада и прочих условий [67]. Воспаление, по сравнению с окислительным стрессом и эксайтотоксичностью, развивается медленнее, но при этом, в отличие от них, продолжается в период до нескольких месяцев после эпизода ишемии [209].

В мозге после ишемии через поврежденные мембраны клеток высвобождаются молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (DAMPs), в частности, белок теплового шока Hsp70, хроматин-связанный белок HMGB1, аденозин и фрагменты цепи ДНК [200]. Данные молекулы через TLR-рецепторы активируют микроглию, а также клетки эндотелия [169].

Активированная микроглия выделяет цитокины, а также приобретает способность к фагоцитозу и презентации антигенов на белках главного комплекса гистосовместимости II класса [81]. Увеличение содержания цитокинов повышает экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках, что приводит к инфильтрации лейкоцитов из периферической крови [48]. Первыми в ткань мозга при ишемии начинают проникать нейтрофилы. Количество нейтрофилов в мозге повышается уже через 30 минут после окклюзии СМА [127]. В ишемизированном мозге нейтрофилы выделяют свободнорадикальные соединения и протеолитические ферменты, вызывающие повреждения ткани [76, 127]. Лимфоциты также опосредуют повреждение мозговой ткани при ишемии. В норме лимфоциты отсутствуют в ЦНС, однако они появляются в мозге через 24 часа после ишемии [129]. Проникшие в ткань мозга иммунные клетки вместе с микроглией также начинают продуцировать цитокины [87]. Цитокины, уровень которых изменяется в ткани мозга при ишемии, можно условно разделить на провоспалительные и противовоспалительные. К провоспалительным относятся в частности интерлейкин-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) и интерлейкин-17 (IL-17) [207, 222].

IL-1 $\beta$ -позитивные клетки микроглии начинают обнаруживаться в ткани мозга через 6 часов после начала инсульта [77, 114]. Увеличение IL-1 $\beta$  приводит к увеличению поступления кальция в клетки через ионные каналы NMDA-рецепторов, что приводит в итоге к смерти нейронов [221]. Также IL-1 $\beta$  усиливает воспаление, активируя клетки микроглии и усиливая миграцию лейкоцитов, путём увеличения экспрессии молекул адгезии на клетках эндотелия, что приводит к нарушению ГЭБ и, как следствие, увеличению площади поражения [53, 145, 172].

IL-17 играет важную роль в отсроченной гибели нейронов при ишемии [61, 206]. Исследование [231] на животных показало, что увеличение экспрессии IL-17 наблюдается спустя 24 ч после инсульта и остается высоким в течение 6 дней. IL-17 может стимулировать миграцию моноцитов через ГЭБ. Также IL-17 вместе с цитокином TNF- $\alpha$  стимулирует продукцию астроцитами хемокина CXCL1, который дополнительно стимулирует инфильтрацию в мозг нейтрофилов [102].

Кроме того, IL-17 стимулирует экспрессию микроглией другого провоспалительного цитокина IL-6 и хемокина CXCL2, а также индуцибельной NO-синтазы (iNOS) [142].

К цитокинам, обладающим противовоспалительным действием при ишемии относят интерлейкин-4 (IL-4) и интерлейкин-10 (IL-10).

Функции IL-4 в мозге при ишемии изучены мало. При этом, нейропротекторная активность IL-4 изучена на клеточных культурах с индуцированным воспалением [142] и на нокаутных по гену IL-4 мышах при фокальной ишемии-реперфузии [142]. IL-4 стимулирует дифференциацию макрофагов по фенотипу M2, которые продуцируют нейротрофические факторы, а также активнее удаляют мертвые участки ткани, способствуя её репарации. Также он стимулирует PPAR-зависимый фагоцитоз апоптотических нейронов [232]. Кроме того, IL-4 стимулирует продукцию нейротрофических факторов астроцитами [65].

IL-10 блокирует продукцию провоспалительных цитокинов, секрецию хемокинов и ингибирует презентацию антигенов макрофагами и микроглией [187]. Кроме того, IL-10 может уменьшать негативные эффекты TNF- $\alpha$ , ингибируя активацию сигнальных путей, индуцированных последним [159]. При моделировании ишемии у крыс, уровень IL-10 в мозге снижается через 12 часов после начала ишемии, но затем увеличивается в несколько раз через двое суток [157].

Уровни данных цитокинов, а также их соотношение в мозге могут служить интегральным показателем процесса воспаления и показывать, доминирует ли в воспалительном ответе повреждающая или репарационная компонента [87, 219, 232].

Воспаление при ишемии является одним из процессов, на который может быть направлена нейропротекторная терапия при инсульте. На модели фокальной ишемии у мышей блокирование молекул межклеточной адгезии и активации комплемента с помощью растворимого рецептора комплемента-1, модифицированного антигеном сиалил Льюис X (sCR1sLe<sup>x</sup>), уменьшает размер

поражения, а также подавляет инфильтрацию нейтрофилов в мозговую ткань [126]. Вместе с тем, при испытании на людях, использование антител против ICAM-1 (препарат энлимомаб) ухудшает показатели активации нейтрофилов и системы комплемента и не приводит к желаемым клиническим результатам. На III фазе клинических исследований, проведенных на 624 пациентах с ишемическим инсультом, продемонстрировано, что при внутривенном введении энлимомаба неврологический дефицит пациентов усиливается, увеличивается частота инфекционных осложнений и возрастает смертность [4, 132]. Ингибирование нейтрофилов также рассматривается как терапевтическая мишень для лечения пациентов с инсультом. Рекомбинантный гликопротеин UK-279,276 в исследовании на крысах, значительно снижал инфильтрацию нейтрофилов и размер очага при фокальной ишемии с реперфузией [137]. При этом, на III фазе клинических исследований, проведенных на 887 пациентах с ишемическим инсультом, для препарата UK-279,276 не доказано значимого улучшения восстановления после ишемии [146].

#### 2.2.5. Апоптоз

Апоптоз является генетически контролируемой формой гибели клеток, в результате которой, клетка распадается на фрагменты, окружённые клеточной мембраной, называемые апоптотическими тельцами, которые затем поглощаются соседними клетками и макрофагами [170].

Небольшое снижение кровотока вызывает гибель клеток преимущественно по пути апоптоза, а не некроза. Так как область ишемической полутени является зоной сравнительно небольшого объема повреждения, где нарушена только функция нейронов генерировать потенциалы действия и при этом частично сохраняется способность к продукции АТФ, в ней преобладает апоптотический путь клеточной гибели [170].

Высвобождение цитохрома С из митохондрий является ключевым звеном апоптотического каскада в ответ на ишемию. Выход цитохрома С обусловлен ионным дисбалансом и набуханием митохондрий, или формированием пор в



наружной митохондриальной мембране. Образование пор происходит в результате комплексного взаимодействия белков семейства Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), некоторые из которых способствуют порообразованию (Bcl-2-associated X protein - Bax, Bcl-2 homologous antagonist/killer - Bak, Bcl-2-associated death promoter - Bad, Bcl-2 protein produced by bim gene - Bim, BH3 interacting-domain death agonist - Bid), тогда как другие его предотвращают (Bcl-2, B-cell lymphoma-extra-large - Bcl-XL, Bcl-2-like protein 2 - Bcl-W). Образование пор происходит посредством олигомеризации белков Bax и/или Bak с Bax, транскрипцию которого индуцирует p53, который в свою очередь активируется повреждениями ДНК. Антиапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-XL могут формировать гетеродимеры с Bax, предотвращая тем самым образование пор [32, 42, 89, 113, 149, 179]. Восприимчивость к ишемии часто коррелирует с экспрессией Bcl-2. Так, в гиппокампе базовый уровень Bcl-2 высок в устойчивых к ишемии пирамидальных нейронах области CA3 и низок в чувствительной к ишемии CA1 области [69].

Баланс про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 регулируется MAP-киназами (MAPK) JNK, ERK1/2 и p38 [71], а также киназой Akt [106]. Активность Akt при ишемии снижается, тогда как активность MAP-киназ возрастает. Увеличение активности JNK приводит к повышению уровня проапоптотических белков. Киназа ERK1/2 через транскрипционный фактор CREB активирует экспрессию антиапоптотических белков Bcl-xL и Bcl-2, а также активирует киназу p90PSK, которая блокирует проапоптотический белок Bad. Киназа p38, с одной стороны, также активирует CREB, с другой стороны индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов [68, 71, 184].

Высвобожденный цитохром C активирует каспазы через формирование апоптосом, состоящих из дезоксиаденозинтрифосфата, цитохрома C, прокаспазы 9 и белка Araf1. Затем эффекторные каспазы 3 и 7 разрушают клетку путём расщепления структурных, метаболических, гомеостатических, репаративных и внутриклеточных сигнальных белков [32].

Ингибирование апоптотических процессов считается перспективным направлением терапии ишемического инсульта. В ряде исследований показано уменьшение ишемического повреждения в результате ингибирования апоптотических каспаз [105]. В частности при делеции гена каспазы-3 снижается гибель клеток в культуре нейронов при гипоксии, а также уменьшается размера очага у нокаутных мышей при 48 ч ишемии с реперфузией [153]. Тем не менее, имеются сообщения, что на моделях глобальной и фокальной ишемии головного мозга у животных ингибиторы каспаз не уменьшают размер инфаркта, что может быть связано с большей тяжестью ишемии, неспособностью пересечь гематоэнцефалический барьер, а также активацией независимых от каспаз путей клеточной смерти [209].

### **2.3. Современные и перспективные подходы к терапии ишемического инсульта**

#### **2.3.1. Основные направления терапии при ишемическом инсульте**

Терапия ишемического инсульта разделяется на два основных направления: восстановление кровотока (реперфузия) и нейропротекция [31]. Нейропротекторная терапия, в свою очередь, может осуществляться при помощи фармакологических средств, а также нефармакологической терапии, как например введение солей магния [155], альбумина [50] и гипотермия [147]. Основными методами восстановления кровотока являются механическое удаление эмбола и применение фармакологических антикоагулянтов. Исследования в области нейропротекции при ишемическом инсульте фармакологическими методами включают в себя ингибирование глутаматно-кальциевого каскада, воспаления, апоптоза. Ещё одним направлением исследований в области нейропротекции является применение антиоксидантов.

### 2.3.2. Антиоксиданты как потенциальные нейропротекторы при ишемическом инсульте

Несмотря на то, что ОС играет важную роль в патогенезе целого ряда нейродегенеративных заболеваний, в том числе ишемии, клинические испытания антиоксидантов за редкими исключениями не выявляют эффективности данных препаратов [95, 139]. Так как при нормальных условиях свободные радикалы являются важными сигнальными молекулами, обеспечивающими нормальную работу нервной ткани и сосудов [91], перспективным направлением может служить разработка антиоксидантных препаратов, активирующихся в патологических условиях [160]. Также представляет интерес оценка нейропротекторного действия антиоксидантов с широким спектром физиологических эффектов [104], к числу которых относится дипептид карнозин, а также гесперетин и кверцетин – вещества, которые относятся к группе флавоноидов. Данные вещества способны проникать через ГЭБ, [1, 85, 133, 217], и для них всех существуют данные о нейропротекторной активности на различных экспериментальных моделях [22, 73, 80, 86, 101, 128, 131, 150, 176, 203, 208, 211].

#### 2.3.2.1. Карнозин

По структуре карнозин является дипептидом  $\beta$ -аланил-L-гистидином. Карнозин в больших количествах обнаруживается в скелетных мышцах различных животных [204]. При интенсивной мышечной работе карнозин может выполнять роль рН-буфера и осморегулятора [2]. Также карнозин обладает способностью хелатировать ионы тяжелых металлов (медь, железо, кобальт, кадмий) [144].

В возбудимых тканях животных карнозин является природным гидрофильным антиоксидантом прямого действия [56]. Карнозин препятствует окислительному повреждению ДНК в лимфоцитах человека в присутствии  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  или  $H_2O_2$  [124]. Активность карнозина в качестве ловушки свободных

радикалов продемонстрирована в экспериментах с клеточными культурами. В исследовании [17] карнозин в концентрации 2 мМ снижет смертность нейронов в культуре клеток мозжечка крысы при окислительном стрессе, индуцированном 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлоридом или ротеноном. Гибель дифференцирующихся клеток PC12 при их инкубации с NMDA также предотвращается карнозином [205]. При этом защитный эффект карнозина ослабляется как  $\alpha$ -торметилгистидином (селективный и необратимый ингибитор гистидиндекарбоксилазы), так и тиоперамидом (селективный антагонист H1- и H3-гистаминовых рецепторов). Защитный эффект карнозина направлен как на NMDA-рецепторы, так и на некоторые гистаминовые рецепторы [205]. Карнозин может быть протектором организма в условиях тотального окислительного стресса. Так, продемонстрировано, что введение карнозина (50 мг/кг массы тела) в пищевой рацион мышей увеличивает их устойчивость к  $\gamma$ -облучению [6, 108].

Карнозин способен поддерживать иммунную систему, ослабленную возрастными изменениями организма животных, при этом у мышей разного возраста эффект карнозина на иммунную систему противоположен [181]. Если у старых животных введение карнозина повышает количество колониеобразующих клеток в селезенке, то у молодых мышей количество колоний в селезенке даже несколько снижается. Таким образом можно заключить, карнозин выступает в организме в качестве иммуномодулятора [6, 16].

Вывод о способности карнозина выступать в качестве антиоксиданта непрямого действия сделан на основе экспериментов *in vitro* и *in vivo* с СОД – ферментом, регулирующим уровень супероксиданиона, инициатора свободнорадикальных процессов [74]. СОД отличается высокой чувствительностью к гидроксид-радикалу, который вызывает фрагментацию белка и подавление его ферментативной активности, поэтому неудивительно, что внесение карнозина в систему *in vitro*, где образуются активные формы кислорода, защищает активность СОД [74, 218]. Аналогичный эффект карнозин проявляет в экспериментах *in vivo*, причем при гораздо меньших концентрациях [5, 23]. Из этого сделан вывод, что карнозин способен проявлять и не прямое

антиоксидантное действие, усиливая эффективность эндогенной системы защиты от окислительного стресса [6].

Кроме антиоксидантной активности, у карнозина выявлен ряд других защитных действий. Карнозин способен препятствовать модификации молекул белков альдегидами (метилглиоксаль, МДА) [115]. Также карнозин может связывать продукты окислительных превращений липидов, в частности, 4,2-гидроксиноненаль [156], защищая таким образом макромолекулы клеток от атаки гидроксиноненалем, который образует функционально дефектные продукты ковалентного присоединения с белками и нуклеиновыми кислотами [6, 57]. Также карнозин препятствует развитию глиобластомы у мышей, снижая экспрессию транскрипционных факторов HIF-1 и NF-κB [43]. Из анализа данных, полученных в эксперименте с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени следует, что карнозин способен индуцировать Mn-SOD, подавлять экспрессию NF-κB и увеличивать соотношение Bcl-2/Bax [6, 55].

Имеется ряд экспериментальных данных, свидетельствующих о перспективности применения карнозина при терапии ишемического повреждения мозга. Так карнозин при введении крысам *per os* в течение 26 дней перед моделированием глобальной ишемии уменьшает содержание лактата в мозге по сравнению с ишемизированными крысами, не принимавшими карнозин [86]. На модели глобальной ишемии-реперфузии головного мозга крыс карнозин при его профилактическом введении животным (в дозе 150 мг/кг) снижает смертность животных по сравнению с контролем. Кроме того, в группе животных, получавших карнозин, обучение поиска пищи в Т-образном лабиринте происходит с меньшим количеством ошибок и достигнутый уровень обучения сохраняется даже после ишемического эпизода [6, 211]. При временной двусторонней окклюзии сонных артерий карнозин увеличивает показатели обучаемости крыс в Т-образном лабиринте [22]. При введении карнозина за 30 минут до начала ишемии, он снижает смертность крыс при глобальной ишемии с билатеральной окклюзией общих каротидных артерий и улучшает показатели электроэнцефалограммы (ЭЭГ) [211]. В работе [197] на модели постоянной

фокальной ишемии у мышей, карнозин при его разовом внутрибрюшинном введении за 30 минут до ишемии в дозах 500 и 1000 мг/кг м.т., уменьшает размер ишемического очага при его измерении через 24 ч после начала ишемии. При постишемическом введении с дозой начального введения 1000 мг/кг м.т. через 2 или 4 часа после начала ишемии и последующими введениями в дозах 500 мг/кг м.т. через каждые 6 ч. в течение суток от начала ишемии, карнозин снижает размер очага при первом введении через 2, но не через 4 часа. Уменьшение размера ишемического очага под действием карнозина на модели постоянной фокальной ишемии на мышцах при внутрибрюшинном введении в дозе 1000 мг/кг м.т. сохраняется и в отсроченный период ишемии вплоть до 7 дней [178]. В работе [46] на модели временной 3 ч фокальной ишемии у крыс с последующей 21 ч реперфузией, карнозин при его внутривенном введении одновременно с началом реперфузии, снижает площадь ишемического очага в дозах 1000 и 2000 мг/кг м.т., но не в дозе 500 мг/кг м.т..

#### 2.3.2.2. Флавоноиды

Флавоноиды представляют собой наиболее многочисленный класс природных фенольных соединений в основе которых лежит дифенилпропановый скелет [19]. По состоянию на 2010 год описано более 8000 различных флавоноидов [27]. О флавоноидах известно, что они обладают разнообразным биологическим действием, в том числе антиоксидантными, противоопухолевыми, антиканцерогенными и противовоспалительными [111].

Флавоноиды, как один из классов минорных биологически активных веществ пищи, могут вносить весомый вклад в наблюдаемое уменьшение риска развития инсульта, связанного с высоким потреблением фруктов и овощей. В самом крупном на сегодняшний день мета-анализе, направленном на выявление связи между употреблением в пищу флавоноидов и риском развития ишемического инсульта, высокий уровень потребления флавоноидов связан с уменьшением риска развития инсульта [215]. Это может быть обусловлено

наличием антиоксидантных, противовоспалительных и антиагрегантных эффектов, а также улучшением состояния эндотелия.

Одними из наиболее перспективных флавоноидов в качестве нейропротекторов при ишемии являются кверцетин и гесперетин. Оба вещества способны проникать через ГЭБ [85, 133, 217], что является необходимым для применения вещества-нейропротектора при патологиях головного мозга. Также для них существуют данные о нейропротекторной активности на различных экспериментальных моделях, в том числе моделях болезни Альцгеймера, окислительного стресса, глобальной ишемии [73, 80, 101, 128, 131, 150, 176, 203, 208].

### Гесперетин

Гесперетин (4'-метокси-3,5,7-тригидроксифлаванон) представляет собой флаванон (подкласс флавоноидов), который представлен в плодах и соках citrusовых [26]. Гесперетин также широко распространен в природе в форме гликозида, который называется гесперидин. Согласно существующим представлениям, большинство поступающих с пищей флавоноидов практически не изменяются в желудке и достигают тонкой кишки в нативном виде [19]. Агликоны, как, например, гесперетин, являясь липофильными веществами, могут всасываться в энтероциты тонкой кишки за счет пассивной диффузии. Однако для всасывания присутствующих в растительных продуктах гликозидов, в том числе флаваноновых, как, например, гесперидин, необходимо их предварительное дегликирование [26], после чего они поглощаются колоноцитами посредством вторично активного транспорта, а также путем пассивной трансцеллюлярной диффузии [63]. В энтероцитах агликоны подвергаются интенсивному метаболизму с образованием глюкуронидов, сульфатов или метильных конъюгатов, которые поступают в кровь либо могут выводиться обратно в просвет тонкого кишечника. Поступившие в кровоток флаваноны (преимущественно конъюгаты) попадают в печень, где происходит их дальнейший метаболизм, после чего они попадают в большой круг

кровообращения и выводятся из организма почками; при этом часть метаболитов транспортируется из гепатоцитов в желчь, что может приводить к их кишечно-печеночной рециркуляции. Так, секретированные в просвет кишечника метаболиты, вместе с другими флавоноидами, не всосавшимися в тонкой кишке, поступают в толстый кишечник, где метаболизируются присутствующей там микрофлорой. После этого образовавшиеся агликаны и продукты их распада всасываются в кровь [26].

Гесперетин, как и прочие флаваноны, также содержится и в других растениях, употребляемых в пищу, однако (за исключением плодов цитрусовых) не является в них доминирующим флавоноидом и к тому же содержится лишь в небольших количествах. Из овощей, в которых обнаружены флаваноны, и, в особенности, гесперетин следует отметить помидоры [19]. Суточное потребление гесперетина у людей составляет в среднем от 5 до 17 мг/сут, в зависимости от региона, возраста и пола [26].

Гесперетин из-за его различных биологических активностей также называют биофлавоноидом. Гесперетин обладает антиоксидантными, противовоспалительными, антиканцерогенными и противоаллергическими действиями [100].

Эффекты гесперетина на ЦНС являются предметом активных исследований в течение последнего десятилетия. Способность гесперетина проникать через ГЭБ подтверждена в 2006 году, и это сделало его перспективным кандидатом для лечения различных заболеваний ЦНС [85]. Результаты недавних исследований показали, что антиоксидантная активность гесперетина заключается не только в способности к прямому удалению радикалов, но она также увеличивается через сигнальный путь Nrf2/ARE, который увеличивает экспрессию ферментов антиоксидантной защиты [90]. В исследовании [101] показано, что гесперетин на модели глобальной церебральной ишемии-реперфузии у крыс улучшает способность к обучению после перенесенной ишемии головного мозга, а также улучшает гистологическую картину, снижая процент разбухших из-за отека нейронов и препятствуя разрушению клеточных мембран. Авторы объясняют это



различными механизмами действия гесперетина, включающими повышение уровня нейротрофического фактора мозга (BDNF) и модуляцию сигнальных путей, связанных с NO.

Гесперетин обладает нейропротекторным действием, защищая клетки нервного гребня РС-12 от цитотоксического действия  $H_2O_2$ , вероятно, благодаря способности нейтрализовать свободные радикалы и предотвращать повышение концентрации ионов кальция и активности каспазы-3 [131]. Также гесперетин может ингибировать индуцированную бета-амилоидом аутофагию и улучшать использование глюкозы в клетках Neuro-2A [128]. Гесперетин демонстрирует нейропротекторное действие как *in vivo*, так и *in vitro*, на моделях, где в качестве повреждающих агентов используются различные цитотоксичные вещества. Например, он оказывает нейропротекторное действие на моделях, где в качестве повреждающих агентов используется амилоид-бета, 3-нитропропионовая кислота и перекись водорода [73, 128, 176]. Защитный эффект гесперетина в основном опосредуется его антиоксидантной и противовоспалительной активностью [176]. Однако другие биологические эффекты, такие как снижение активности каспазы-3, регулирование внутриклеточной концентрации ионов кальция, улучшение энергетического метаболизма нейронов и восстановление функций поврежденных митохондрий, также вносят свой вклад в общее протекторное действие гесперетина [73, 128, 223]. Гесперетин может также оказывать благотворное влияние на ЦНС за счет ингибирования нитрозативного стресса. Это подтверждается тем, что ингибитор синтазы оксида азота L-NAME потенцирует защитный эффект гесперетина на модели перенесенного острого иммобилизационного стресса у мышей и также предотвращает развитие митохондриальной дисфункции [220].

### Кверцетин

Кверцетин (3,3', 4', 5,7-пентагидроксифлавонон) является широко распространенным флавонолом, который содержится во многих фруктах и овощах. Среди овощей самый высокий уровень кверцетина обнаружен в луке,

спарже и листовом красном салате, более низкий - в брокколи, зеленом перце, горохе и томатах. Яблоки наряду с вишнями и различными ягодами - это фрукты с самым высоким содержанием кверцетина. Диетическое потребление флавонолов довольно сильно различается в разных регионах и составляет от 5,4 мг/сут (Финляндия) до 64 мг/сут (Япония). Кверцетин является основным компонентом подкласса флавонолов, поступающим с пищей. Его потребление составляет 60-75% от всех флавонолов. Кверцетин в пищевых продуктах чаще присутствует не как агликон (то есть без сахарных групп), а в форме гликозидов [26].

В литературе описан широкий спектр биологических активностей кверцетина, в том числе антиоксидантные, нейропротекторные, противовирусные, антиканцерогенные, антибактериальные, противовоспалительные и гепатопротекторные [19]. Все это сделало кверцетин препаратом с большими перспективами для профилактики и терапии различных заболеваний, в том числе, ишемического инсульта [212].

Химическая структура кверцетина определяет его выраженные антиоксидантные действие. Кверцетин содержит пять гидроксильных групп, присутствие которых отвечает за биологическую активность соединения, а также наличие большого числа его производных. Структурными группами, ответственными за стабильность и антиоксидантную активность кверцетина, являются ортодигидрокси- или катехольная группа (две гидроксильные группы в положениях 3',4'), 3- и 5-ОН-группы при конъюгации с оксогруппой в 4-положении. Кверцетин способен выступать донором протона для свободных радикалов и превращаться в промежуточное соединение хинона, которое стабилизируется электронами, передаваемыми своими функциональными группами [117]. Также кверцетин обладает и защитным эффектом от гамма-радиации [15].

Антиоксидантная активность кверцетина объясняется тем, что в его составе содержится много ОН-групп и конъюгированная p-орбиталь, которые действуют как отличные доноры электронов или ионов  $H^+$  [33]. Антиоксидантная активность кверцетина зависит от уровня восстановленного глутатиона. Высокая

концентрация восстановленного глутатиона способствует формированию продукта глутатион-кверцетин, усиливая антиоксидантную активность кверцетина. Тогда как низкий уровень восстановленного глутатиона увеличивает уровень продукта кверцетин-кверцетин, который может обладать прооксидантным действием, вызывая тем самым повреждение клеток [199]. Кверцетин способен блокировать образование свободных радикалов на стадии образования супероксидных радикалов дыхательной цепью митохондрий, образования радикалов липида комплексом цитохрома С с кардиолипином и ПОЛ [7]. Кверцетин также обладает и противоопухолевой активностью, усиливая апоптоз в опухолевых клетках. Проапоптотический эффект кверцетина специфически проявляется только против опухолевых клеток, что делает его возможным для применения в качестве адъювантного препарата в составе комплексной химиотерапии онкологических заболеваний [40].

Нейропротекторные эффекты кверцетина продемонстрированы в различных моделях повреждения головного мозга, включая ишемию-реперфузию. В исследовании [203] на модели гидростатической травмы головного мозга у крыс, кверцетин, вводимый внутрибрюшинно через 1 час после травмы, значительно предотвращает снижение количества восстановленного глутатиона в коре головного мозга, а также увеличивает значения амплитуд вызванных потенциалов у крыс, по сравнению с контрольной группой. На модели, в которой ОС в головном мозге крыс индуцировался внутрижелудочковым введением колхицина, употребление кверцетина вместе с рационом в течение 25 дней (4 дня до и 21 день после введения колхицина) улучшает показатели когнитивных функций, а также снижает уровень маркеров ОС, по сравнению с контрольной группой [150]. В другом исследовании показано, что полилактидные нанокapsулы с кверцетином оказывают прямое нейропротекторное действие и снижают уровень маркеров окислительного стресса у крыс на модели глобальной церебральной ишемии. Также в группе крыс, получавших кверцетин, уровень восстановленного глутатиона в ткани головного мозга выше, чем у контрольной группы. Эти эффекты кверцетина вызывает как у молодых, так и у старых крыс [80]. В

исследовании [208] проведено сравнение способности кверцетина и другого синтетического флавоноида FB277 нейтрализовать супероксид-анион, который образуется в головном мозге у крыс при глобальной церебральной ишемии-реперфузии. Кверцетин при внутривенном введении снижает содержание супероксид-аниона в коре головного мозга, синтетический флавоноид FB277 не обладает таким эффектом. В работе [154] также продемонстрирован положительный эффект кверцетина на течение ишемического инсульта на крысах с использованием метода фототромбоза. Экспериментальная группа крыс получала кверцетин внутрибрюшинно через 1 час после начала ишемии и затем каждые 12 часов в течение 3 дней. Кверцетин значительно снижает возрастание активности матриксных металлопротеиназ, снижает развивающийся отек мозга и улучшает неврологическую симптоматику. В работе [35] нейропротекторное действие кверцетина изучено на модели ишемии-реперфузии у крыс. Кверцетин вводили интраперитонеально за 1 час до начала ишемии, а также через интервалы в 0, 24, 48 и 72 часа. Кверцетин оказывает прямое нейропротекторное действие, выражающееся в уменьшении ишемического очага по сравнению с контрольной группой, а также улучшает неврологическую симптоматику.

Таким образом, для гесперетина, а также кверцетина и карнозина существуют убедительные литературные данные, демонстрирующие их способность проникать через ГЭБ. Данное обстоятельство является необходимым для применения вещества-нейропротектора при ишемии головного мозга. Также для этих веществ существуют данные о нейропротекторной активности на различных экспериментальных моделях. В то же время остается малоизученным вопрос об эффективности применения данных веществ в условиях фокальной ишемии головного мозга как при их профилактическом, так и терапевтическом применении. При этом, в литературе отсутствуют исследования, посвященные нейропротекции данных веществ, как компонентов пищевого рациона, при ишемическом инсульте.

## 2.4. Способы моделирования ишемического инсульта головного мозга в экспериментальных исследованиях

В связи с большой распространенностью ишемического инсульта актуальным является углубление знаний о механизмах развития ишемического повреждения головного мозга и разработка новых методов для профилактики и лечения ишемического инсульта. Крайне важным для проведения таких исследований является адекватность выбора экспериментальной модели. Добиться воспроизведения всех особенностей ишемического инсульта у человека в одной животной модели невозможно. Поэтому выбор наиболее подходящей модели патологического состояния является одной из первых задач в любом исследовании ишемии [98].

Модели ишемического инсульта можно разделить на эксперименты *in vitro* и *in vivo*. Для моделирования ишемии *in vitro* широко используются первичные нейро-глиальные культуры коры, гиппокампа, мозжечка эмбриональных или новорожденных крыс и мышей. Также используются переживающие срезы разных отделов мозга, в особенности, гиппокампа. Условия ишемии в таких моделях вызывают посредством замены в инкубационной среде кислорода на азот. Если при этом в клеточной культуральной среде сохраняют глюкозу, то такое воздействие называют гипоксией, а если среду клеткам заменяют на безглюкозную, то это называют глюкозо-кислородной депривацией. Кроме того, в некоторых экспериментах клетки лишают только глюкозы, оставляя при этом кислород (глюкозная депривация). Также гипоксия может быть вызвана химическими агентами, например, солями цианида (NaCN или KCN). При таком способе моделирования гипоксии генерируется большее количество АФК, чем при кислородной депривации. К преимуществам *in vitro* моделей можно отнести их сравнительную простоту, высокую степень контроля экспериментальной системы, а также возможность изучения ответа отдельных типов клеток на ишемическое повреждение. Однако такие модели имеют ряд существенных отличий от клинической картины инсульта. Для достижения значимого уровня

смертности, клетки необходимо достаточно долго держать в бескислородной среде (от 1 часа до суток), тогда как при клиническом инсульте гибель нейронов начинается уже через несколько минут после прекращения кровотока. Падение уровня АТФ и выход глутамата из нейронов в моделях *in vitro* происходят медленнее, чем при инсульте у человека. Ввиду отсутствия кровеносных сосудов и кровотока, в данных моделях не воспроизводятся важные компоненты ишемического повреждения, в частности, инфильтрация в ткань клеток воспаления. Кроме того, состав глиальных клеток и их реакция на ишемию в пробирке отличается от таковых в интактном мозге. Таким образом, модели *in vitro* могут быть дополнением к экспериментальным моделям на животных, позволяя тестировать потенциальные нейропротекторы и регистрировать клеточный ответ, оценивая при этом механизмы как ишемии, так и протекции [226].

Модель фокальной ишемии головного мозга является наиболее распространенной для изучения ишемического инсульта. У человека ишемический инсульт чаще всего возникает при нарушении кровотока в бассейне СМА или ее ветвей. Фокальная ишемия может быть как постоянной, так и временной. При постоянной ишемии моделируется клиническая ситуация, при которой эмбол перекрывает просвет сосуда надолго и восстановления кровотока не происходит. При временной ишемии моделируется клиническая ситуация, при которой после различного времени окклюзии происходит восстановление кровотока в пораженной части мозга в результате восстановления проходимости сосуда. Это происходит либо в результате спонтанной реканализации тромба, либо после использования тромболитической терапии. В исследованиях на животных все методики окклюзии сосудов мозга можно разделить на внутри- и внесосудистые [4].

В большинстве внесосудистых моделей используют аппликацию эндотелина-1 на одну из мозговых артерий, клипирование, перевязку или электрокоагуляцию СМА и ее ветвей непосредственно на поверхности мозга, после краниотомии. К преимуществам таких моделей можно отнести хорошую

воспроизводимость размера инфаркта, низкую смертность животных, особенно в сопоставлении с постоянной интралюминальной окклюзией СМА, а также отсутствие некроза глубоких структур мозга [98].

К внутрисосудистым методикам моделирования фокальной ишемии относят модель окклюзии СМА филаментом (тонкой нитью с силиконовым наконечником, которая перекрывает просвет сосуда) и введение тромба через катетер непосредственно во внутреннюю сонную артерию [4]. Одной из наиболее используемых моделей фокальной ишемии мозга на сегодняшний день является методика интралюминальной окклюзии СМА по Longa [161]. К плюсам внутрисосудистых методик можно отнести формирование обширной зоны пенумбры, сходной с таковой при инсульте у человека, относительную простоту процедуры (в частности, не требуется кранеотомия). Также данные модели хорошо подходят для изучения процессов воспаления и повреждения гематоэнцефалического барьера при инсульте [98].

В данной работе было использовано 2 модели фокальной ишемии на крысах: модель внутрисосудистой ишемии с репфузией по Longa [161], и модель внесосудистой ишемии по Chen. et al [70]. В первом случае выбор модели обусловлен тем, что на ней действие веществ исследовалось в остром периоде (через 24 ч), благодаря чему смертность животных при ишемии была низкой. При этом, данная модель позволяла получить достаточно большое количество образцов мозга для биохимических исследований. Выбор внесосудистой модели для исследования действия карнозина в отставленном периоде ишемии (через 72 ч) обусловлен низкой смертностью животных в данной модели в отсроченном периоде.

Основным критерием эффективности любого вещества при инсульте является его нейропротекторное действие. В исследованиях фокальной ишемии на животных наиболее объективным показателем данного действия является площадь очага некроза в мозге, которая была оценена на первом этапе данной работы.

Ввиду того, что ключевые патофизиологические процессы в мозге при ишемическом инсульте связаны с ОС, при изучении веществ-потенциальных нейропротекторов представляется разумным в первую очередь оценивать их влияние на ОС и параметры антиоксидантной защиты в мозге и крови. В данной работе действие веществ на оксидативный статус мозга при ишеми оценивали по трём основным направлениям: ферментативная антиоксидантная защита (активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы), неферментативная антиоксидантная защита (общая антиоксидантная защита, резистентность к окислению, содержание восстановленного глутатиона), а также содержание продуктов перекисноо окисления липидов и белков (МДА, гидроперекиси липидов, изопростаны, карбонильные производные белков), которое является показателем степени развития окислительного стресса. Помимо мозга, был исследован оксидативный статус плазмы крови при ишеми, чтобы оценить системное действие веществ.

Кроме того в данной работе было изучено влияние веществ на процесс воспаления при инсульте, поскольку воспалительные процессы, в зависимости от направления своего развития, могут способствовать как повреждению, так и нейропротекции ткани мозга при ишемии. В качестве интегративного показателя, преобладает ли в воспалительном ответе при ишемии повреждающий или восстановительный компонент, в данной работе использовали содержание провоспалительных (IL-1b и IL-17) и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов



### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Содержание животных и состав рационов

В работе использовали крыс-самцов линии Вистар, полученных из питомника «Столбовая». Крыс содержали в индивидуальных клетках в условиях искусственного освещения (12-ти часовой цикл день/ночь) при температуре  $25\pm 1^\circ\text{C}$  и относительной влажности воздуха 60-80% на подстилке из древесных стружек. Наблюдение за состоянием животных и количеством потребления корма проводили ежедневно, определение массы тела - 2-3 раза в неделю. Забой животных проводили путем декапитации.

В работе с животными руководствовались принципами, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1986 г.). Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом (Протокол № 14 от 28.11.2014 г.). В качестве корма, в экспериментах по моделированию ишемии с реперфузией, крысы получали рацион, аналогичный коммерческому рациону AIN-93M (таблица. 3.1 - 3.3), из расчёта 20 грамм сухого корма на крысу в сутки. В экспериментах по моделированию необратимой ишемии, крысы получали стандартный коммерческий виварный полусинтетический корм *ad libitum*.

**Таблица 3.1** – Состав полусинтетического рациона

Компонент	Содержание в рационе, г на 100г
Казеин	20,0
Крахмал кукурузный	60,05
Целлюлоза микрокристаллическая	5,0
Солевая смесь	3,5
Холин хлорид (60% холина)	0,25
L-цистеин	0,2
Витаминная смесь	1,0
Масло подсолнечное	5,0
Лярд (свиной жир)	5,0

**Таблица 3.2** – Состав солевой смеси

Название соли	Формула	Количество вещества на 1 кг смеси, г
Кальций углекислый, безводный	$\text{CaCO}_3$	357
Калий фосфорнокислый, одноосновный	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250
Натрий хлористый	$\text{NaCl}$	74
Калий сернокислый	$\text{K}_2\text{SO}_4$	46,6
Калий лимоннокислый, моногидрат	$\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	28
Магния оксид	$\text{MgO}$	24
Железо лимоннокислое	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,06
Цинк углекислый	$\text{ZnCO}_3$	1,65
Марганец углекислый	$\text{MnCO}_3$	0,63
Медь углекислая	$\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$	0,3
Калия йодат	$\text{KIO}_3$	0,01
Натрия селенат, безводный	$\text{Na}_2\text{SeO}_4$	0,01025
Аммония парамолибдат, 4-водный	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,00795
Натрия метасиликат	$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	0,63
Хромокалиевые квасцы, 12-водные	$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$	0,275
Борная кислота	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,0815
Натрий фтористый	$\text{NaF}$	0,0635
Никель углекислый	$\text{NiCO}_3 \cdot 2\text{Ni}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	0,0318
Литий хлористый	$\text{LiCl}$	0,0174
Аммония ванадат	$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0,0066
Сахароза (декстроза, глюкоза)	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	210,626

**Таблица 3.3** – Состав витаминной смеси

Витамин	Количество витамина на 1 кг смеси, г
Никотиновая кислота (В <sub>3</sub> )	3
Пантотенат кальция (В <sub>5</sub> )	1,6
Пиридоксина гидрохлорид (В <sub>6</sub> )	0,7
Тиамина гидрохлорид (В <sub>1</sub> )	0,6
Рибофлавин (В <sub>2</sub> )	0,6
Фолиевая кислота (В <sub>9</sub> )	0,2
D-биотин (В <sub>7</sub> )	0,02
Цианкобаламин (В <sub>12</sub> )	0,0025
Менадион (витамин К <sub>1</sub> )	0,075
Витамин А (Dry Vitamin A Acetate, DSM, 500 000 МЕ/г)	0,8
Витамин D <sub>3</sub> (холекальциферол, Dry Vitamin D <sub>3</sub> , DSM, 100 000 МЕ/г )	1
Витамин Е (Dry Vitamin Е 50% - dl-alpha-tocopheryl acetate, DSM, 500 МЕ/г)	8
Сахароза	983,4025

### 3.2. Дизайны экспериментов

В экспериментах по изучению действия карнозина, кверцетина и гесперетина в условиях фокальной ишемии-реперфузии использовали две контрольные группы: ложнооперированные крысы «контроль 1» и крысы, которым моделировали ишемию «контроль 2». Опытные группы, в которых крысам перед ишемией давали карнозин, кверцетин или гесперетин, носили названия соответственно «ишемия+карнозин», «ишемия+кверцетин» и «ишемия+гесперетин». Крысы обеих контрольных групп в течение недели перед

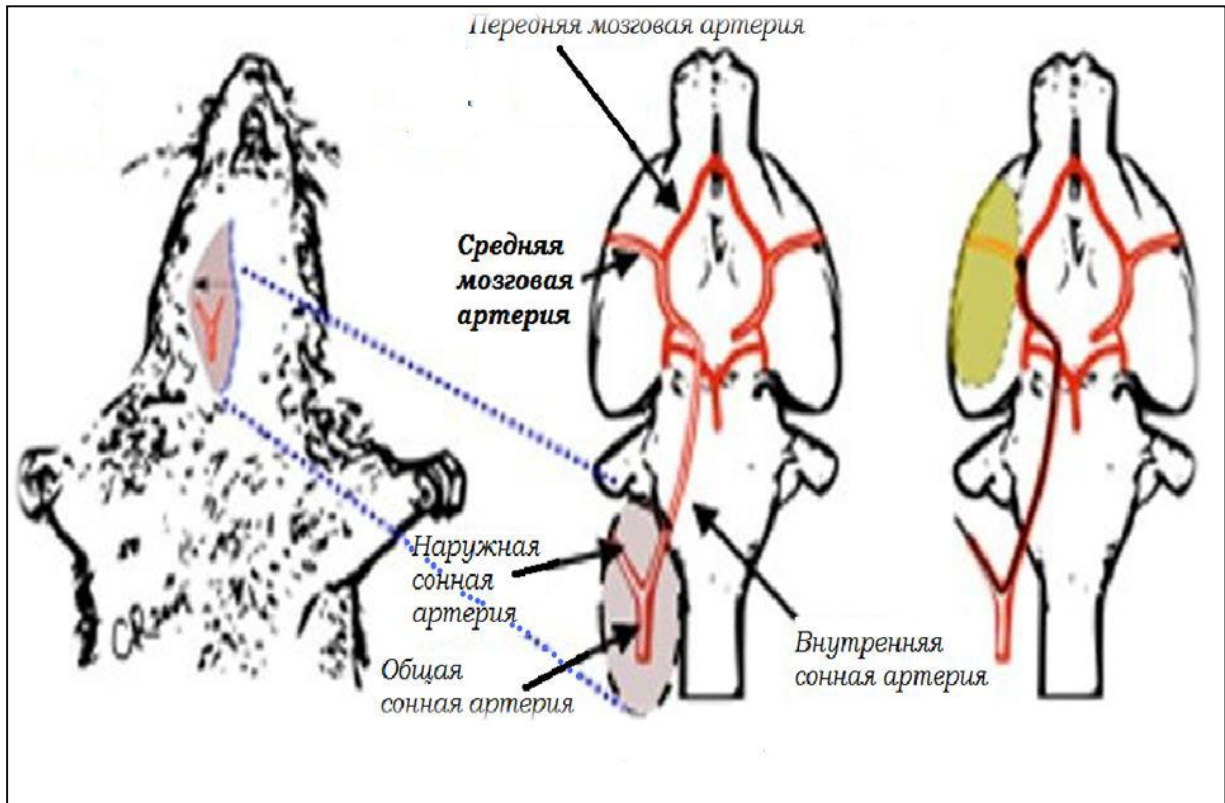
операцией получали полусинтетический корм. Крысы групп с карнозином кверцетином или гесперетином в течение недели перед операцией получали полусинтетический корм с добавлением карнозина из расчёта 150 мг/кг массы тела в сутки, либо с добавлением кверцетина/гесперетина из расчёта 50 мг/кг массы тела в сутки. Во время операции группе «контроль 1» проводили все этапы хирургического вмешательства, кроме окклюзии среднемозговой артерии. В группе «контроль 2» и в опытных группах крысам на 60 минут пережимали среднемозговую артерию при помощи филамента. Через 24 часа после операции животных забивали, после чего забирали мозг и плазму крови для биохимических исследований, либо только мозг для оценки размера очага

В экспериментах по изучению действия карнозина в условиях необратимой фокальной ишемии также использовали две контрольные группы: интактные крысы «контроль 1» и крысы, которым моделировали ишемию «контроль 2». Опытные группы, в которых крысам при ишемии давали карнозин в дозах 10, 50 или 500 мг/кг м.т в сутки, носили названия соответственно «ишемия+карнозин 10 мг/кг», «ишемия+карнозин 50 мг/кг» и «ишемия+карнозин 500 мг/кг». Во время операции крысам групп «контроль 2» и всех опытных групп пережигали левую ветвь среднемозговой артерии при помощи электрокоагуляции. Карнозин вводили через 15 мин, 24 ч и 48 ч, в дозах 10, 50 и 500 мг/кг м.т в сутки для соответствующих экспериментальных групп. Контрольным животным по аналогичной схеме вводили 0,9% NaCl. Животных забивали либо через 72 ч после операции, после чего забирали мозг для оценки площади ишемического очага, либо через 24 ч, после чего забирали мозг и плазму крови для биохимических исследований

### 3.3. Модели фокальной ишемии головного мозга

#### Модель фокальной ишемии-реперфузии

Фокальную ишемию головного мозга с реперфузией моделировали с помощью интралюминальной окклюзии СМА (рисунок 3.1) по методике, описанной в работе [161].



**Рисунок 3. 1** – схема интралюминальной окклюзии средней мозговой артерии у крыс

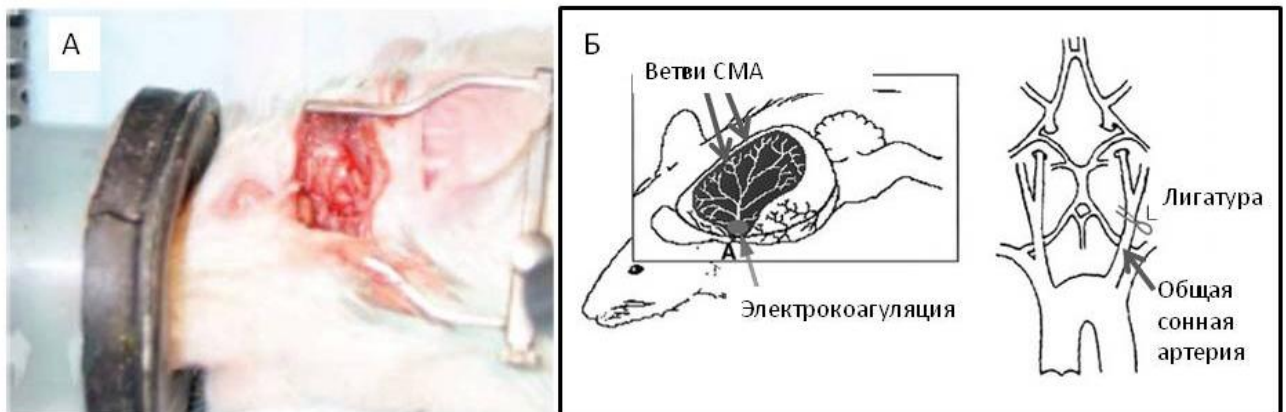
Наркотизированное животное (10% раствор хлоралгидрата, внутривенно, доза: 400 мг/кг м.т.) фиксировали на спине на операционном столе. Область шеи выбривали, обрабатывали 95% спиртовым раствором. Затем проводили разрез кожи по срединной линии шеи, рассекали подкожную фасцию, отодвигали с помощью ретрактора щитовидную железу. Затем под микроскопом выделяли сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально – грудино-ключично-сосцевидной мышцей и медиально – грудино-подъязычной мышцей. В сонном треугольнике выделяли сонный сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом.

Осторожно отделяли блуждающий нерв и накладывали микрохирургическую сосудистую титановую клипсу на общую сонную артерию на 0,5-1 см ниже ее бифуркации. Затем осторожно выделяли из спаек наружную и внутреннюю сонные артерии и с помощью биполярного коагулятора коагулировали две ветви наружной сонной артерии – затылочную артерию и верхнюю щитовидную артерию. На дистальный конец наружной сонной артерии накладывали лигатуру и крепко ее затягивали, на проксимальный конец накладывали вторую лигатуру и не затягивали ее. На внутреннюю сонную артерию накладывали микрохирургическую сосудистую клипсу. Между двумя лигатурами на наружной сонной артерии с помощью микрохирургических ножниц производили артериотомию и через надрез в просвет наружной сонной артерии вставляли филамент, вокруг него фиксировали лигатуру и продвигали филамент в общую сонную артерию до упора в клипсу. Филаменты (фирма «DOCCOL corporation», США), использованные в эксперименте представляют собой нейлоновую нить размером 4-0, диаметр 0,19 мм, длина 30 мм, с силиконовым покрытием на конце - длина покрытия 2-3 мм, диаметр филамента с покрытием  $0,39 \text{ мм} \pm 0,02 \text{ мм}$ . Затем наружную сонную артерию перерезали до конца, филамент разворачивали и осторожно продвигали во внутреннюю сонную артерию до упора в клипсу. Клипсу снимали и продвигали филамент глубже во внутреннюю сонную артерию. В области отхождения крыловидно-небной артерии филамент продвигали медиально до ощущения сопротивления. В зависимости от веса животного снаружи оставалось  $10 \pm 2$  мм филамента. Таким образом, с помощью силиконового наконечника филамента перекрывали место отхождения СМА. Филамент оставляли на 60 минут, затем его осторожно вынимали, до упора силиконового наконечника в лигатуру. На внутреннюю сонную артерию накладывали микрохирургическую сосудистую клипсу, филамент осторожно вынимали, лигатуру затягивали наглухо и коагулировали культю наружной сонной артерии. Затем снимали микрохирургические сосудистые клипсы, рану послойно ушивали, местно обрабатывали раствором антибиотика (гентамицина). Подкожно в область шва вводили 2% раствор лидокаина для послеоперационного

обезболивания. Внутривенно вводили 1 мл физиологического раствора для профилактики обезвоживания. Затем животное помещали на подогреваемую подстилку до выхода из наркоза, и далее перемещали в индивидуальную клетку до окончания эксперимента. Ложнооперированным животным проводили все вышеописанные манипуляции, кроме установки филамента. Среднее время от разреза кожи до постановки филамента составляло  $15 \pm 2$  минуты [4].

### Модель необратимой фокальной ишемии головного мозга

Необратимую фокальную ишемию головного мозга у крыс моделировали путем дистальной окклюзии средней мозговой артерии по методике [70]. Ишемическое повреждение создавали электрокоагуляцией левой ветви средней мозговой артерии и подходящей к ней вены с одновременной перевязкой ипсилатеральной сонной артерии для стабилизации объема поражения (рисунок 3.2).



**Рисунок 3. 2** – Схема электрокоагуляции средней мозговой артерии у крыс линии Wistar. А - изображение наркотизированной крысы с трипанованным черепом. В операционном окне виден фрагмент мозга. Б - схематическое изображение места электрокоагуляции и накладывания лигатуры

Операцию проводили под общей анестезией (хлоралгидрат, 400 мг/кг внутривенно). На шее животных отпрепаровывали левую сонную артерию и проводили под нее лигатуру. Далее делали разрез на коже посередине между левой ушной раковиной и левым глазом, раздвигали волокна височной мышцы и открывали поверхность черепа. С помощью бормашины, диаметр бора 0,5 мм, в

месте шва чешуйчатой кости с лобной делали отверстие диаметром около трех-четырёх миллиметров, обнажая место пересечения средней мозговой артерии с нижней мозговой веной. Под бинокулярной лупой (фирма «Альтами», Россия) снимали твердую мозговую оболочку и при помощи электрокоагулятора Alifator 1310 Plus (фирма «Doxion», Германия) проводили необратимую окклюзию левой ветви средней мозговой артерии проксимальнее места ее бифуркации на фронтальную и париетальную ветви, а также рядом расположенной мозговой вены до ее пересечения с артерией. Сразу после коагуляции перевязывали лигатуру, на которой находилась сонная артерия.

### **3.4. Оценка площади ишемического очага**

Для оценки площади ишемического очага замороженные образцы головного мозга разрезали во фронтальной плоскости на срезы толщиной 1-2 мм и окрашивали в 2% растворе 2,3,5 трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) в натрий-фосфатном буфере (0.1 М, рН = 7,4) при 37°C в течение 10 минут. Отсканированные изображения обрабатывали с помощью программы Image J. Площадь очага для учёта индивидуальной вариабельности его размера и отёка мозга рассчитывали в процентах от контралатерального полушария [11].

### **3.5. Отбор проб для биохимических исследований и приготовление гомогенатов ткани мозга**

У декапитированных животных извлекали головной мозг, из которого вырезали либо ишемизированное полушарие целиком, либо приочаговую зону коры и симметричную ей кору контралатерального полушария, после чего выделенные фрагменты замораживали при -80°C. После выделения приочаговой зоны оставшийся мозг нарежали на серию фронтальных срезов и окрашивали 2% раствором ТТХ для контроля за правильностью выделения приочаговой зоны. Фотография окрашенных срезов мозга представлена на рисунке 3.3.





Примечание – красным цветом окрашена интактная ткань, белым – зона некроза. На среднем срезе видно отсутствие фрагмента коры мозга, выделенного для биохимических исследований. При этом видно, что мёртвая ткань (не окрашена) не попала в выделенный участок коры, что говорит о правильности его выделения

**Рисунок 3.3** – Изображение срезов мозга, окрашенных трифенилтетразолий хлоридом для оценки правильности выделения приочаговой зоны

Ткань мозга гомогенизировали в холодном натрий-фосфатном буфере (0,1M, pH=7,4) в соотношении 10 мл буфера на 1 г ткани мозга (гомогенизатор Поттера-Эльвейема; режим 900 об/мин, 1 минуту). Полученный гомогенат разделяли на 3 части. Первую часть гомогената замораживали в нативном виде для метода железо-индуцированной хемилюминесценции (ХЛ). Вторую часть гомогената центрифугировали при 1000 g в течение 3 минут при 4°C. Полученный супернатант замораживали при -80°C и затем использовали для определения МДА. Третью часть гомогената центрифугировали при 12000 g в течение 15 минут при 4°C. и замораживали при -80°C. Полученную постмитохондриальную фракцию гомогената использовали для определения активности антиоксидантных ферментов, содержания карбонильных производных белков, изопростанов и интерлейкинов в ткани мозга.

Кровь у крыс отбирали в стеклянные пробирки с предварительно добавленным гепарином из расчёта 1000 МЕ/мл крови, затем центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об/мин. Полученную плазму крови замораживали при -80° С для последующих исследований [11].

### 3.6. Биохимические методы исследования

#### Определение общей активности супероксиддисмутазы

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли в мозге и в плазме крови по методу [185], основанному на торможении исследуемым материалом скорости восстановления супероксид-радикалом нитросинего тетразолия (НСТ). Супероксид-радикал в реакционной смеси генерируется при аэробном взаимодействии в системе NADH-феназинметсульфат (ФМС). Образующийся супероксид-радикал восстанавливает НСТ до бисформаза, регистрируемого при длине волны 540 нм. СОД в экспериментальном образце конкурирует с НСТ за супероксид-радикалы, снижая количество восстановленного бисформаза.

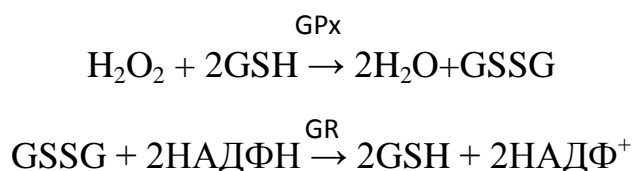
Измерения проводили на спектрофотометре GENESYS 2 В реакционную смесь общим объёмом 1,81 мл, содержащую 2 мМ Na-пирофосфатный буфер с 2 мМ Na-ЭДТА (рН=8,3), добавляли 50 мкл постмитохондриальной фракции мозга или 100 мкл плазмы крови, 170 мкл 0,5 мМ раствора нитросинего тетразолия в буфере и 170 мкл 1,4 мМ раствора NADH в буфере. Реакцию запускали добавлением 170 мкл 22,2 мкМ раствора феназинметасульфата в буфере. Далее реакционную смесь быстро перемешивали и регистрировали изменение оптической плотности в течение одной минуты при  $\lambda = 540$  нм. Активность СОД вычисляли по формуле:

$$A = [(1 - A_{\text{оп}}/A_{\text{фон}}) * 2 * V_{\text{смеси}}/V_{\text{пробы}} * C_{\text{ткани}}] / C_{\text{белка}} \quad (1)$$

где  $A_{\text{оп}}$  - изменение оптического поглощения в течение 1 минуты при добавлении опытного образца,  $A_{\text{фон}}$  - изменение оптического поглощения в течение 1 минуты в отсутствии опытного образца,  $V_{\text{смеси}}$  (л)- общий объём реакционной смеси,  $V_{\text{пробы}}$  (л)- объём добавленного образца,  $C_{\text{ткани}}$  (г/л)- отношение веса образца мозга к количеству добавленного буфера при приготовлении гомогената.  $C_{\text{белка}}$  (мг/г ткани) - содержание белка в пробе. Активность СОД выражали в Ед/мин на мг белка [25].

### Определение активности глутатионпероксидазы

Активность глутатионпероксидазы (ГП) определяли в мозге и в плазме крови по методу [97] в сопряженной системе с глутатионредуктазой, по скорости окисления NADPH, расходуемого на восстановление окисленного глутатиона. В качестве субстрата для глутатионпероксидазы использовали пероксид водорода.



Измерения проводили на спектрофотометре GENESYS 2. В реакционную среду общим объемом 2,45 мл, содержащую 0,1 М фосфатный буфер pH 7,0, 1мМ ЭДТА, 1,0 мМ азида натрия, 1,0 мМ восстановленного глутатиона, 0,2 мМ восстановленного NADPH и 2 МЕ глутатионредуктазы, добавляли 50 мкл постмитохондриальной фракции мозга или 100 мкл плазмы крови. Реакцию запускали добавлением 0,25 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, перемешивали и измеряли изменение оптической плотности при λ=340 нм в течение 1 мин при 30° С. Активность ГП рассчитывали по формуле

$$A = \frac{\Delta D \times V_{\text{смеси}} \times 10^9}{\varepsilon \times V_{\text{пробы}} \times C_{\text{ткани}} \times C_{\text{белка}}} \quad (2)$$

где ΔD - изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 минуту, V<sub>смеси</sub> (л)- общий объем реакционной смеси, 10<sup>9</sup> - пересчет на нмоль НАДФН, ε (М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) - коэффициент экстинкции NADPH (6620), V<sub>пробы</sub> (л)- объем добавленного образца, C<sub>ткани</sub> (г/л)- отношение веса образца мозга к количеству добавленного буфера при приготовлении гомогената. C<sub>белка</sub> (мг/г ткани) - содержание белка в пробе.

Активность ГП выражали в наномоль окисленного NADPH / мин / мг белка [25].

### Определение активности глутатионтрансферазы

Активность глутатионтрансферазы (ГТ) определяли в мозге по методу [110]. Измерения проводили на спектрофотометре GENESYS 2. В реакционную среду общим объемом 3 мл, содержащую 0,1 М фосфатный буфер pH 6,5 и 1,0 мМ восстановленного глутатиона, вносили 0,1 мл постмитохондриальной фракции гомогената мозга. Реакцию запускали добавлением 1 мМ субстрата 1-хлор-2,4-динитробензола (ДХНБ) в спиртовом растворе (не более 1,7% этанола в реакционной смеси), и регистрировали изменение оптической плотности при  $\lambda=340$  нм в течение 1 мин при 25°C. Активность ГТ рассчитывали по формуле

$$A = \frac{\Delta D \times V_{\text{смеси}} \times 10^3}{9,8 \text{ мкмоль/мл}^{-1} \text{ см}^{-1} \times V_{\text{пробы}} \times C_{\text{ткани}} \times C_{\text{белка}}} \quad (3)$$

где  $\Delta D$  - изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 минуту,  $V_{\text{смеси}}$  (мл)- общий объём реакционной смеси,  $10^3$  - пересчет на нмоль ДХНБ,  $9,8 \text{ мкмоль/мл}^{-1} \text{ см}^{-1}$  - коэффициент экстинкции ДХНБ,  $V_{\text{пробы}}$  (мл)- объём добавленного образца,  $C_{\text{ткани}}$  (г/мл)- отношение веса образца мозга к количеству добавленного буфера при приготовлении гомогената.  $C_{\text{белка}}$  (мг/г ткани) - содержание белка в пробе

Активность ГТ выражали в нмоль / мин / мг белка [25].

### Определение активности каталазы

Активность каталазы (КАТ) определяли в мозге по методу [34], заключающемуся в измерении уменьшения количества пероксида водорода в реакционной среде под действием фермента. Измерения проводили на спектрофотометре GENESYS 2. К 2,9 мл 0,067 М фосфатного буфера (pH =7,4), добавляли 0,15 мл постмитохондриальной фракции гомогената мозга. Реакцию запускали добавлением 12,5 мкл 10% раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Далее регистрировали изменение оптической плотности при  $\lambda=240$  нм в течение 1 мин. Активность КАТ рассчитывали по формуле

$$A = \frac{\Delta D \times V_{\text{смеси}}}{36 \text{ ммоль/мл}^{-1} \text{ см}^{-1} \times V_{\text{пробы}} \times C_{\text{ткани}} \times C_{\text{белка}}} \quad (4)$$

где  $\Delta D$  - изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 минуту,  $V_{\text{смеси}}$  (мл)- общий объём реакционной смеси,  $36 \text{ ммоль/мл}^{-1} \text{ см}^{-1}$  - коэффициент экстинкции пероксида водорода  $V_{\text{пробы}}$  (мл)- объём добавленного образца,  $C_{\text{ткани}}$  (г/мл)- отношение веса образца мозга к количеству добавленного буфера при приготовлении гомогената.  $C_{\text{белка}}$  (мг/г ткани) - содержание белка в пробе

Активность КАТ выражали в мкмоль/ мин / мг белка [25]

### Определение общей антиоксидантной активности

Общую антиоксидантную активность (АОА) ткани мозга и плазмы крови определяли в модельной системе FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) [51], основанной на восстановлении комплекса  $\text{Fe}^{3+}$  -2,4,6-трипиридил-s-триазина (ТРТЗ) в  $\text{Fe}^{2+}$  -ТРТЗ в кислой среде под действием внесенных восстановителей. Измерения проводили на спектрофотометре GENESYS 2. Исследуемый материал (плазма крови, постмитохондриальная фракция гомогенатов мозга) в количестве 60 мкл вносили в реакционную среду общим объемом 1,86 мл, содержащую 0,83 мМ ТРТЗ и 1,67 мМ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в 0,25 М ацетатном буфере pH 3,6. Затем измеряли оптическую плотность при  $\lambda=593$  нм в течение 4 мин. Антиоксидантную активность рассчитывали по калибровочному графику, результаты представляли в  $\text{Fe}^{2+}$  эквивалентах.

### Железо-индуцированная хемилюминесценция

В работе использовали модификацию метода железо-индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) [92]. Метод заключается в регистрации хемилюминесценции, инициированной ионами двухвалентного железа в плазме крови и гомогенатах ткани мозга экспериментальных животных.

Измерение параметров ХЛ проводилось совместно с сотрудником Научного центра неврологии Фёдоровой Т.Н.. Измерения проводили на приборе LKB 1251 (Швеция) К 0,2 мл 10% тканевого гомогената добавляли 0,8 мл фосфатного буфера (60 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 105 мМ  $\text{KCl}$  при pH 7,45). Кювету с полученной суспензией помещали в измерительную камеру прибора и регистрировали

показания фоновых величин. Для инициирования хемилюминесценции в кювету вносили 0,1 мл раствора двухвалентного железа ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) в конечной концентрации - 2,5 мМ и регистрировали кривую люминесценции. В работе анализировали уровень преобразованных гидроперекисей липидов, регистрируемый по амплитуде быстрой вспышки ХЛ (h, мВ) и резистентность субстрата к окислению, определяемую по латентному периоду ( $\tau$ , с).

#### Определение содержания восстановленного глутатиона

Для определения содержания восстановленного глутатиона использовали метод [166], основанному на реакции глутатиона (GSH) с реактивом Элмана. Измерения проводили на спектрофотометре GENESYS 2. К 0,7 мл свежеприготовленного гомогената добавляли 0,8 мл 6% ТХУ, затем центрифугировали при 7000 об/мин 8 мин, при 4°C. Затем к 0,5 мл надосадочной жидкости добавляли 2 мл 0,4М Трис-НСl буфера, содержащего 5 мМ ЭДТА (рН=8,8), и 50 мкл 0,01 М реактива Элмана, разведенного на метаноле, после чего реакцию смесь перемешивали и измеряли оптическое поглощение при 412 нм.

Количество GSH рассчитывали по следующей формуле:

$$C_{SH-глют} = \frac{\Delta D \times V_{смеси}}{13600 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1} \times m_{ткани}} \quad (5)$$

где  $\Delta D$  - оптическая плотность образца с поправкой на значение слепой пробы,  $V_{смеси}$  (мл)- общий объём реакционной смеси,  $13600 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  - коэффициент экстинкции нитроотиобензойной кислоты,  $m_{ткани}$  (г)- масса ткани, в реакционной смеси.

Содержание восстановленного глутатиона выражали в мМ на грамм ткани.

#### Определение содержания малонового диальдегида

Для определения МДА в плазме крови и ткани мозга использовали, соответственно, методы [177] и [186], основанные на образовании окрашенного триметилового комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой при высокой

температуре и низком значении pH. Измерения проводили на спектрофотометре Agilent HP 8453 (США). К 0,2 мл плазмы крови добавляли 3 мл 2% ортофосфорной кислоты и 1 мл 0,8% раствора тиобарбитуровой кислоты с последующим инкубированием проб на водяной бане при 99,9°C в течение 45 мин.

Для определения МДА в ткани мозга к 0,2 мл 10% гомогената мозга добавляли 1,5 мл 20% раствора уксусной кислоты, 0,2 мл 8,1% раствора додецилсульфата натрия, 1,5 мл 0,8% раствора тиобарбитуровой кислоты, 0,7 мл дистиллированной воды с последующим инкубированием проб на водяной бане при 99°C в течение 60 мин. Далее, для обоих методов, к смеси добавляли 3 мл бутанола, окрашенную фракцию которого далее отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 5000 об/мин с последующим определением в ней оптической плотности при  $\lambda=535$  нм с коррекцией при  $\lambda=580$  нм. Концентрацию МДА в пробах рассчитывали по следующей формуле:

$$C_{\text{МДА}} = \frac{D \times V_{\text{бутанола}} \times 10^9}{1,56 \times 10^5 \times m_{\text{ткани}}} \quad (6)$$

где  $\Delta D$  - оптическая плотность образца,  $V_{\text{бутанола}}$  (л)- общий объём реакционной смеси,  $10^9$  - пересчет на нмоль,  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .- коэффициент экстинкции конъюгата ТБК с МДА,  $m_{\text{ткани}}$  (г)- масса ткани, в реакционной смеси

Содержание МДА выражали в нмоль на грамм ткани или мл плазмы [25].

#### Определение содержания карбонильных производных белков

Содержание карбонильных производных белков (КПБ) определяли в ткани мозга и в плазме крови по методу [225]. Измерения проводили на спектрофотометре Agilent HP 8453 (США). Для анализа КПБ в мозге в пробирку вносили 400 мкл воды, 100 мкл 10% стрептомицина и 500 мкл образца, перемешивали и центрифугировали 10 мин при 11 000 g. Далее в две чистые пробирки (контроль, опыт) для каждой пробы вносили 800 мкл 2 М р-ра HCl (контроль) или 10 мМ раствор 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФГ) в 2 М HCl (опыт), а также по 200 мкл надосадочной жидкости и встряхивали на шейкере 10

минут в темноте. При определении КПБ в плазме крови пропускали этап с использованием стрептомицина и сразу вносили по 50 мкл неразбавленной плазмы в пробирки с HCl и 2,4-ДНФГ. Далее добавляли к пробам по 1000 мкл 20% трихлоруксусной кислоты и центрифугировали пробирки при 2 000 г в течение 2 мин. Осадок трижды промывали смесью этанол-этилацетат (1/1) и добавляли к нему 200 мкл 6М раствора гуанидин хлорида в 0,5 М  $K_3PO_4$  (pH 2,5) и встряхивали пробирки в темноте при 37<sup>0</sup>С в течение 15 мин. Измеряли поглощение контрольной и опытной проб при 276 нм (белок) и 370 нм (карбонильные производные) с коррекцией на 1000 нм. Содержание карбонильных производных определяли по формуле:

$$C_{КПБ} = \frac{D_{370} \times \varepsilon_{276(\text{белок})} \times 10^9}{M_{\text{белок}} \times (D_{276} - 0,43 \times D_{370}) \times \varepsilon_{370(\text{карбонил})} \times 10^3} \quad (7)$$

где  $D_{370}$  – поглощение на 370 нм (карбонильные производные – ДНФ-гидразоны);  $D_{276}$  – поглощение на 276 нм (белок);  $D_{276} - 0,43 * D_{370}$  – вычитание поглощения, обусловленного ДНФ-гидразонами ( $\varepsilon_{276}$  гидразонов = 9460  $M^{-1}cm^{-1}$ );  $\varepsilon_{370(\text{карбонил})}$  – молярный коэффициент светопоглощения ДНФ гидразонов на 370 нм (=22000  $M^{-1}cm^{-1}$ );  $\varepsilon_{276(\text{белок})}$  – молярный коэффициент светопоглощения стандартного белка средней молекулярной массой 50 000 Да (=50000  $M^{-1}cm^{-1}$ );  $10^9$  – поправка на наномоль;  $10^3$  – поправка на миллиграмм.

Содержание КПБ выражали в нмоль на грамм ткани или мл плазмы [25].

#### Определение содержания изопростанов в мозге

Содержание изопростанов в ткани мозга определяли методом иммуноферментного анализа при помощи коммерческого набора фирмы «Enzo Life Sciences» (Швейцария), кат. номер ADI-900-091. К 1 мл 2N NaOH добавляли 100 мкл 10% гомогената мозга в фосфатном буфере (pH=7,4), инкубировали 2 ч при 45<sup>0</sup>С, затем нейтрализовывали 1 мл 2N HCl. Затем пробирки центрифугировали 5 мин при 3000g при 4<sup>0</sup>С. Дальнейшие манипуляции с супернатантом, а также приготовление реактивов, стандартов и измерения



проводили согласно инструкции производителя. Измерения проводили на планшетном фотометре ЭФОС-9305.

#### Определение содержания цитокинов в мозге

Содержание цитокинов в постмитохондриальной фракции гомогенатов мозгов определяли методом мультиплексного анализа, при помощи коммерческого набора фирмы «Bio-Rad» (США), состоящего из базового набора, набора стандартов и комплектов для измерения противовоспалительных цитокинов: интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-10 (IL-10); и провоспалительных цитокинов: интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и интерлейкин- IL-17а. Измерения проводили на приборе Luminex 200 (США).

#### Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг выполняли по протоколу, приведённому в работе [18]. Анализ проводился совместно с сотрудником Научного центра неврологии Лопачёвым А.В.. Образцы ткани мозга лизировали в RIPA буфере (фирма «Sigma», США), содержащем коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз (фирма «Sigma», США). Лизат центрифугировали при 12000g в течение 10 мин, затем отбирали супернатант. Концентрацию белка в пробах измеряли с помощью набора реактивов DC Protein Assay Kit (фирма «Bio-Rad», США). Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли, переносили на PVDF-мембрану Westran Clear Signal (фирма «Whatman», Великобритания) и проводили окрашивание антителами в соответствии с рекомендациями производителей. Были использованы первичные антитела к Vax, Vak, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Akt, p-Akt, p38 (фирма «Cell Signaling Technology», США), p-p38, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK и  $\beta$ -актину (фирма «Santa Cruz Biotechnology», США), а также вторичные антитела anti-goat, anti-rabbit (фирма «Santa Cruz Biotechnology», США) и anti-mouse (фирма «Cell Signaling Technology», США), конъюгированные с пероксидазой хрена. Мембраны проявляли при помощи хемилюминесцентного субстрата Super Signal West Femto Maximum Sensitivity

Substrate или Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (фирма «Thermo Scientific», США). Люминесценцию полос детектировали при помощи системы гель-документирования ChemiDoc XRS+ (фирма «Bio-Rad», США), интенсивность обсчитывали при помощи программы Image Lab 3.0 (фирма «Bio-Rad», США). Уровень экспрессии белков семейства Bcl-2 оценивали по отношению интенсивности полос исследуемого белка к интенсивности полос  $\beta$ -актина. Активацию киназ оценивали по уровню фосфорилирования, т.е. отношению интенсивности полос фосфорилированной формы киназы к интенсивности ее общей формы [18].

#### Определение содержания общего белка

Содержание общего белка измеряли с помощью набора реактивов DC Protein Assay Kit (фирма «Bio-Rad», США). Для определения белка постмитохондриальную фракцию гомогенатов мозгов разводили деионизированной водой в 4 раза, плазму крови - в 100 раз. Измерения проводили на планшетном фотометре ЭФОС-9305.

#### **3.7. Методы статистической обработки**

Статистическую обработку проводили с использованием программ Statistica 64 и Microsoft Excel 2007. Для определения достоверности различий в случае сравнения двух экспериментальных групп использовали U-критерий Манна-Уитни. В случае сравнения трёх экспериментальных групп и более использовали тест Краскела-Уоллеса с последующим попарным сравнением групп. Различия считались достоверными при значении  $p < 0,05$ . Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Изучение влияния биологически активных веществ пищи на размер ишемического очага при фокальной ишемии головного мозга

#### 4.1.1. Изучение влияния карнозина, кверцетина и гесперетина на размер ишемического очага при фокальной ишемии-реперфузии мозга

Результаты данного раздела представлены в работах [13, 24].

Предварительный прием животными карнозина приводил к снижению площади ишемического очага в среднем на 21 % по сравнению с группой «контроль 2» ( $32,2 \pm 1,5\%$  и  $25,9 \pm 2,5\%$  от площади контралатерального полушария для группы «контроль 2», и группы «ишемия+карнозин», соответственно). Предварительное включение гесперетина в рацион животных значительно уменьшало площадь ишемического очага на 30 % по сравнению с группой «контроль 2» ( $38,8 \pm 3,7\%$  и  $27,1 \pm 3,2\%$  от площади контралатерального полушария для группы «контроль 2», и группы «ишемия+ гесперетин», соответственно). Кверцетин в составе рациона, в аналогичных экспериментальных исследованиях, не вызывал значимого уменьшения площади ишемического очага ( $38,8 \pm 3,7\%$  и  $33,0 \pm 3,2\%$  от площади контралатерального полушария для группы «контроль 2», и группы «ишемия+ кверцетин», соответственно).

В данной работе впервые выявлено нейропротекторное действие карнозина в дозе 150 мг/кг м.т. в сутки при его профилактическом применении в составе рациона до вызывания фокальной ишемии. Полученные в настоящей работе данные указывают на способность карнозина оказывать нейропротекторное действие при значительно меньших дозах в условиях его курсового профилактического введения с рационом.

Таким образом, в представленной работе показана эффективность карнозина и гесперетина при их профилактическом применении в условиях моделирования фокальной ишемии/реперфузии головного мозга у крыс линии Wistar.

#### 4.1.2. Изучение влияния карнозина на размер ишемического очага при необратимой фокальной ишемии мозга

Результаты данного раздела представлены в работе [28].

Введение карнозина в дозе 50 мг/кг и 500 мг/кг массы тела в сутки приводило к снижению площади ишемического очага на 27% и 39%, соответственно, по отношению к группе «контроль 2» ( $32,3 \pm 2,8\%$  для группы «контроль 2», для группы «ишемия+карнозин 50 мг/кг»  $24,5 \pm 2,7\%$  и  $19,8 \pm 6,2\%$  для группы «ишемия+карнозин 500 мг/кг» от площади коры ипсилатерального полушария). Карнозин в дозе 10 мг/кг массы тела в сутки не приводил к достоверному снижению площади очага некроза ( $25,7 \pm 6,3\%$  для группы «ишемия+карнозин 10 мг/кг» от площади коры ипсилатерального полушария).

Таким образом, введение карнозина в условиях 72 ч ишемии головного мозга (через 15 мин, 24 ч и 48 ч после начала операции), в дозе 50 мг/кг или 500 мг/кг массы тела в сутки значимо снижало площадь очага некроза при необратимой фокальной ишемии головного мозга.

### **4.2. Изучение действия биологически активных веществ пищи на биохимические показатели в крови и ткани мозга при фокальной ишемии мозга**

#### 4.2.1. Исследование действия карнозина на показатели окислительного стресса и воспаления при фокальной ишемии-реперфузии мозга

Результаты данного раздела представлены в работе [12].

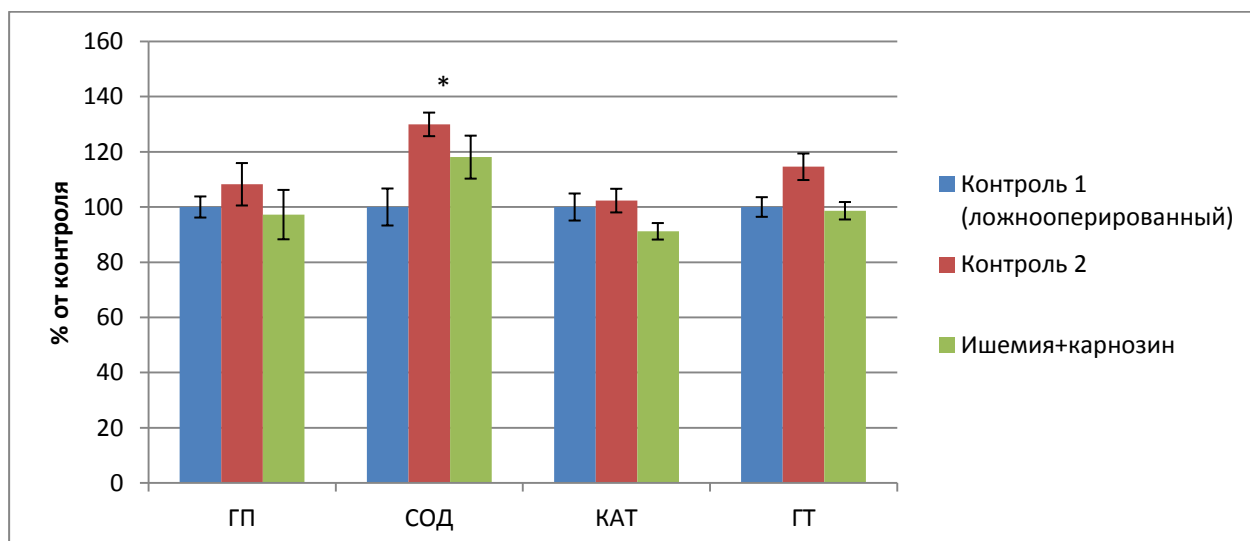
60 мин ишемия с последующей 24 ч реперфузией вызывала увеличение активности СОД в ткани мозга крыс на 30% по сравнению с группой «контроль 1» и не влияла на активность других ферментов (ГП, КАТ и ГТ). (таблица 4.4, рисунок 4.1). В плазме крови (таблица 4.5, рисунок 4.2) изменений активности исследуемых ферментов антиоксидантной системы защиты (АОЗ) при ишемии относительно контроля 1 отмечено не было. Включение карнозина в рацион не

оказывало значимого влияния на активность ферментов СОД, КАТ, ГП и ГТ ни в мозге (таблица 4.1, рисунок 4.1), ни в плазме крови (таблица 4.2, рисунок 4.2).

**Таблица 4.1** – Влияние карнозина на активность ферментов системы антиоксидантной защиты в мозге крыс при фокальной ишемии

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+карнозин
ГП (нмоль окисл НАДФН/(мин*мг белка))	19,8±0,8	21,4±1,5	19,2±1,8
СОД (активность /(мин*мг белка))	3,24±0,22	4,21±0,14*	3,82±0,25
КАТ (мкмоль /(мин*мг белка))	4,31±0,21	4,41±0,18	3,93±0,13
ГТ (мкмоль /(мин*мг белка))	73,6±2,6	84,3±3,5	72,6±2,3

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

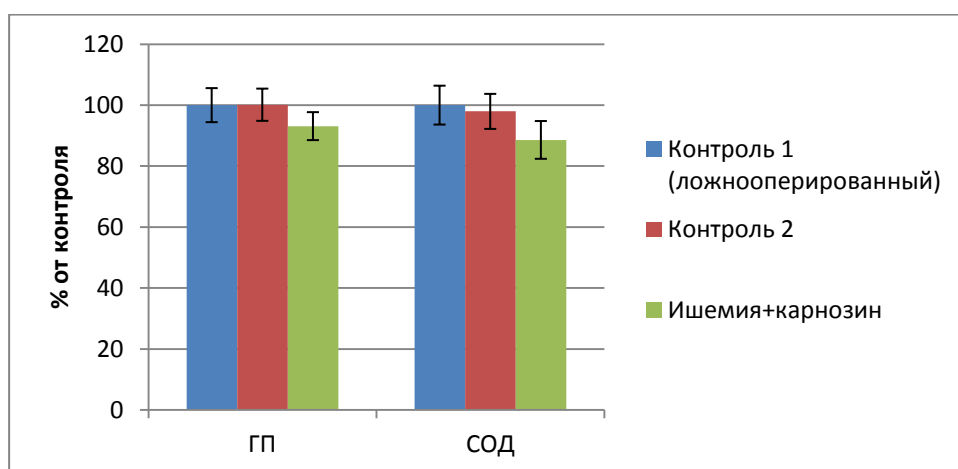


\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.1** – Влияние карнозина на активность ферментов системы антиоксидантной защиты в ткани мозга крыс при фокальной ишемии

**Таблица 4.2** – Влияние карнозина на активность ферментов системы антиоксидантной защиты в плазме крови крыс при фокальной ишемии

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+карнозин
ГП (нмоль окисл НАДФН/(мин*мг белка))	3,09±0,17	3,10±0,16	2,88±0,14
СОД (активность /(мин*мг белка))	0,147±0,009	0,144±0,008	0,130±0,009



**Рисунок 4.2** – Влияние карнозина на активность ферментов системы антиоксидантной защиты в плазме крови крыс при фокальной ишемии

У крыс, перенесших фокальную ишемию, снижалась на 26% ферментативная общая антиоксидантная активность ткани мозга, регистрируемая по методу FRAP, а также снижалась на 39% резистентность ткани мозга к окислению, регистрируемая при помощи ХЛ, по сравнению с контролем 1 (таблица 4.3, рисунок 4.3). В плазме крови влияния ишемии на АОА и резистентность к окислению выявлено не было (таблица 4.4, рисунок 4.4).

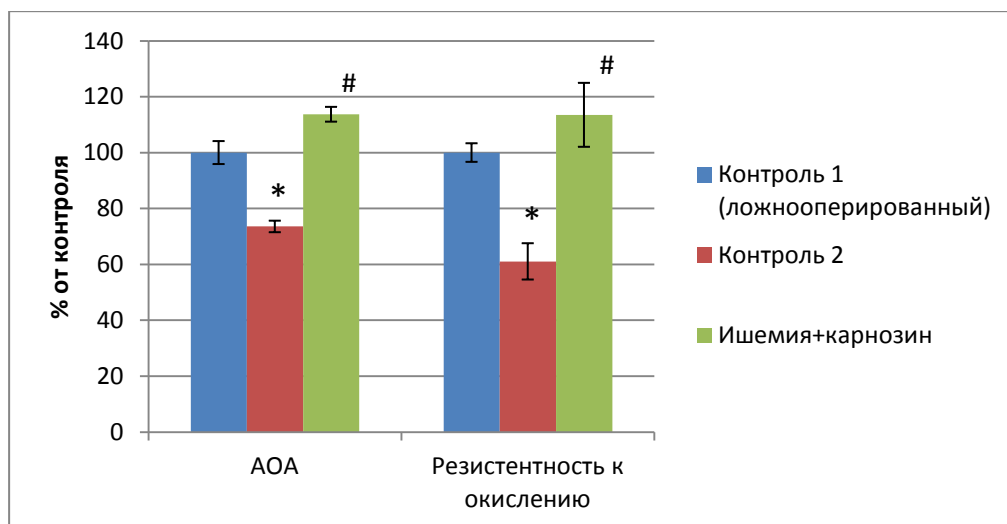
У животных, получавших карнозин перед 24 ч ишемией, карнозин способствовал увеличению АОА ткани мозга на 54%, по сравнению с контролем 2. Также карнозин увеличивал на 85% резистентность ткани мозга к окислению относительно контроля 2. В плазме крови у животных, при профилактическом приеме карнозина в составе пищевого рациона, после перенесенной ишемии,

увеличивалась резистентность к окислению на 106 %, по сравнению с контролем 2.

**Таблица 4.3** – Влияние карнозина на показатели неферментативной антиоксидантной защиты в мозге крыс при фокальной ишемии

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+карнозин
АОА (мМ эквивалента Fe <sup>2+</sup> )	7,54±0,31	5,55±0,16*	8,57±0,20 <sup>#</sup>
Резистентность к окислению (сек)	80,5±2,7	49,2±5,2*	91,4±9,2 <sup>#</sup>

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»



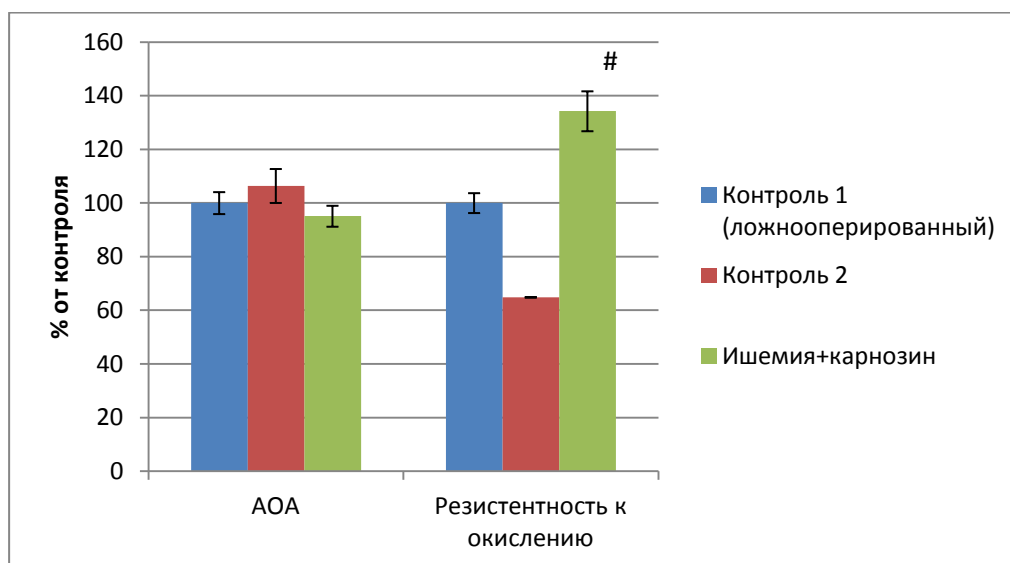
\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

**Рисунок 4.3** – Влияние карнозина на показатели неферментативной антиоксидантной защиты в мозге крыс при фокальной ишемии

**Таблица 4.4** – Влияние карнозина на показатели неферментативной антиоксидантной защиты в плазме крови крыс при фокальной ишемии

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+карнозин
АОА (мМ эквивалента Fe <sup>2+</sup> )	0,398±0,016	0,423±0,025	0,378±0,016
Резистентность к окислению (сек)	61,7±2,3	40,0±0,0	82,8±4,6 <sup>#</sup>

# - p<0,05 - по отношению к группе «контроль 2»



# - p<0,05 - по отношению к группе «контроль 2»

**Рисунок 4.4** – Влияние карнозина на показатели неферментативной антиоксидантной защиты в плазме крови крыс при фокальной ишемии

Уровень гидроперекисей липидов в ткани мозга крыс, после перенесенной 24 ч фокальной ишемии, снижался на 22% по сравнению с контролем 1. Аналогично уровень МДА в ткани мозга крыс, после ишемии, снижался на 33% по сравнению с контролем 1. Значимого влияния ишемии на уровень КПБ и изопростанов в мозге животных зарегистрировано не было (таблица 4.5, рисунок 4.5). В плазме крови измеряемые уровни гидроперекисей липидов, МДА и КПБ у животных после ишемии не отличались от уровней, регистрируемых у контроля 1 (таблица 4.6, рисунок 4.6).

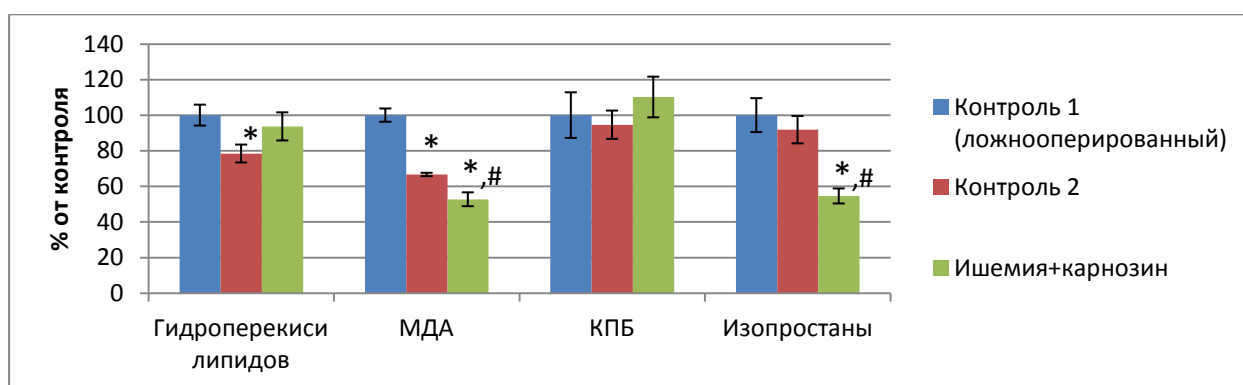


Содержание МДА после приёма карнозина в мозге животных уменьшалось на 48 % по сравнению с контролем 1 и на 21 %, относительно контроля 2. При этом содержание изопростанов в мозге животных группы «ишемия+карнозин» уменьшалось на 40 %, по сравнению с контролем 2. Влияния карнозина на уровень гидроперекисей липидов и КПБ в ткани мозга после 24 ч ишемии с реперфузией отмечено не было. В плазме крови животных с ишемией карнозин не приводил к значимым изменениям уровней гидроперекисей липидов, МДА, и КПБ.

**Таблица 4.5** – Влияние карнозина на уровень продуктов перекисного окисления липидов и белков в ткани мозга крыс при фокальной ишемии

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+карнозин
Гидроперекиси липидов (мВ)	149±9	117±8*	139±12
МДА (нмоль/г ткани)	159±5	106±1*	84±6*,#
КПБ (нмоль/мг белка)	12,2±1,6	11,5±0,9	13,4±1,4
Изопростаны (пг/мг ткани)	192±18	176±15	105±8*,#

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

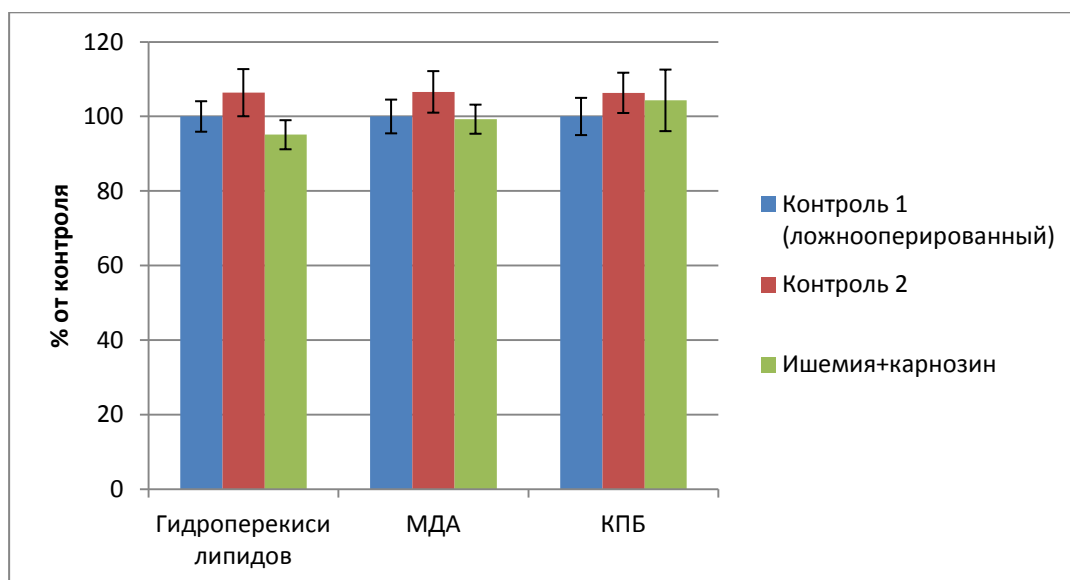


\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

**Рисунок 4.5** – Влияние карнозина на уровень продуктов перекисного окисления липидов и белков в ткани мозга крыс при фокальной ишемии

**Таблица 4.6** – Влияние карнозина на уровень продуктов перекисного окисления липидов и белков в плазме крови крыс при фокальной ишемии

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+карнозин
Гидроперекиси липидов (mB)	58,6±1,8	55,8±1,0	59,3±2,7
МДА (нмоль/ мл)	5,60±0,25	5,97±0,31	5,56±0,22
КПБ (нмоль/мг белка)	5,38±0,27	5,72±0,29	5,61±0,44



**Рисунок 4.6** – Влияние карнозина на уровень продуктов перекисного окисления липидов и белков в плазме крови крыс при фокальной ишемии

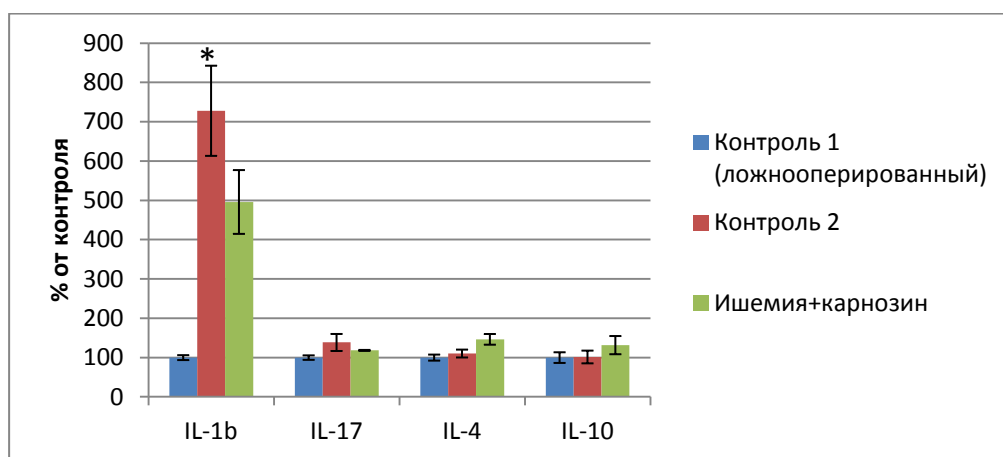
При измерении цитокинов в ишемизированном полушарии мозга, в группе животных, перенёсших 24 ч ишемию, было отмечено увеличение провоспалительного цитокина IL-1b на 628% по сравнению с контролем 1. Влияния ишемии на уровень других цитокинов (IL-4, IL-10 и IL-17) отмечено не было (таблица 4.7, рисунок 4.7).

После добавления карнозина в рацион крыс не было отмечено значимых изменений уровня как провоспалительных (IL-1b и IL-17), так и противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-10) в ткани мозга животных с ишемией, которые могут обладать нейропротекторным действием.

**Таблица 4.7** – Влияние карнозина на уровень про- и противовоспалительных цитокинов в ткани мозга крыс при фокальной ишемии (пг/мг ткани)

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+карнозин
IL-1b	0,26±0,02	1,92±0,30*	1,31±0,21
IL-17	0,96±0,06	1,33±0,21	1,14±0,01
IL-4	0,023±0,002	0,025±0,002	0,034±0,003
IL-10	0,740±0,101	0,752±0,121	0,975±0,172

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.7** – Влияние карнозина на уровень про- и противовоспалительных цитокинов в ткани мозга крыс при фокальной ишемии

Полученные результаты и анализ литературных данных позволяют заключить, что карнозин в составе пищи при его предварительном приёме уменьшает повреждение ткани мозга при фокальной ишемии, и его эффект в основном обусловлен прямым антиоксидантным действием: как нейтрализацией свободных радикалов, так и связыванием продуктов окислительного повреждения липидов.

#### 4.2.2. Исследование действия кверцетина и гесперетина на показатели окислительного стресса и воспаления при фокальной ишемии-реперфузии

Результаты данного раздела представлены в работе [13].

При фокальной ишемии после 24-часовой реперфузии в мозге увеличивалась активность двух ферментов антиоксидантной защиты: СОД на 29%

и ГТ на 26% относительно контроля 1. Различий в уровне активности ГП и КАТ в мозге животных, перенесших 60 мин. ишемию с последующей 24 ч реперфузией относительно животных группы «контроль 1» выявлено не было (таблица 4.8, рисунок 4.8). Изменений ферментов антиоксидантной активности в плазме крови относительно контроля 1 у крыс, группы «контроль 2», обнаружено не было (таблица 4.9, рисунок 4.9).

Ни кверцетин, ни гесперетин не вызывали значимых изменений в активности антиоксидантных ферментов в ткани мозга. В плазме крови после добавления в рацион ишемизированных животных кверцетина или гесперетина было обнаружено значимое снижение активности супероксиддисмутазы по сравнению с контрольными животными.

**Таблица 4.8** – Влияние кверцетина и гесперетина на активность ферментов системы антиоксидантной защиты в мозге крыс при фокальной ишемии

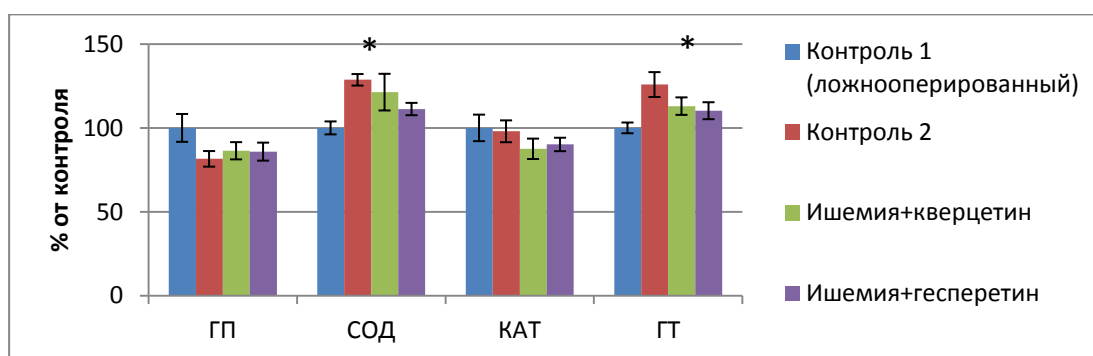
	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+ кверцетин	Ишемия+ гесперетин
ГП (нмоль окисл НАДФН/(мин*мг белка))	18,4±1,5	15,0±0,9	15,9±0,9	15,8±1,0
СОД (активность /(мин*мг белка))	3,38±0,13	4,35±0,12*	4,10±0,37	3,76±0,12
КАТ (мкмоль /(мин*мг белка))	3,85±0,30	3,77±0,25	3,37±0,23	3,47±0,15
ГТ (нмоль /(мин*мг белка))	49,2±1,6	61,9±3,7*	55,6±2,6	54,2±2,5

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Таблица 4.9** – Влияние кверцетина и гесперетина на активность ферментов системы антиоксидантной защиты в плазме крови крыс при фокальной ишемии

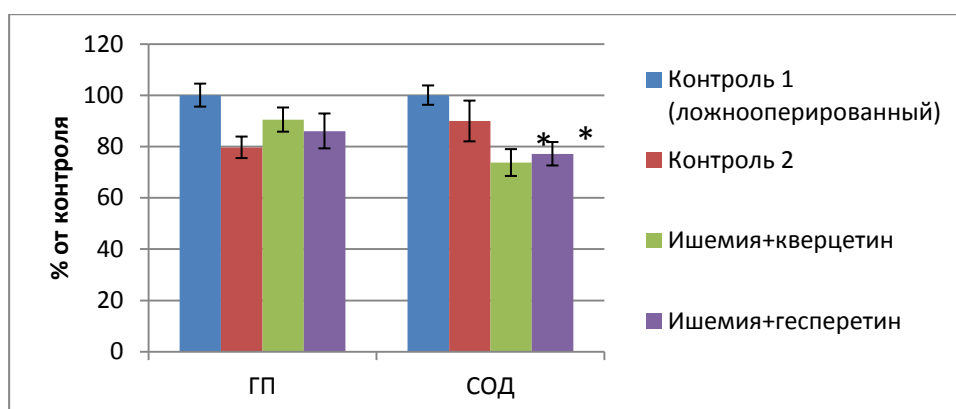
	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+ кверцетин	Ишемия+ гесперетин
ГП (нмоль окисл НАДФН/ (мин*мг белка))	4,61±0,21	3,67±0,19	4,17±0,22	3,97±0,31
СОД (активность /(мин*мг белка))	0,213±0,008	0,191±0,017	0,157±0,011*	0,164±0,010*

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.8** – Влияние кверцетина и гесперетина на активность ферментов системы антиоксидантной защиты в мозге крыс при фокальной ишемии



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.9** – Влияние кверцетина и гесперетина на активность ферментов системы антиоксидантной защиты в плазме крови крыс при фокальной ишемии

При исследовании показателей антиоксидантной активности, в ткани ишемизированного полушария мозга крыс группы «контроль 2», на 29%

уменьшался уровень восстановленного глутатиона относительно контроля 1. Снижение АОА, регистрируемой в системе FRAP, в мозге крыс с ишемией, в данном эксперименте, не достигало значимого уровня относительно контроля 1 (таблица 4.10, рисунок 4.10). Ишемия не влияла на АОА в плазме крови животных, перенесших ишемию с последующей реперфузией (таблица 4.11, рисунок 4.11).

При добавлении в рацион животных с ишемией как кверцетина, так и гесперетина в мозге не изменялась общая антиоксидантная активность, а также содержание восстановленного глутатиона по сравнению с группой «контроль 2». Вместе с тем, в плазме крови после приёма кверцетина у животных с ишемией значительно повышалась АОА на 21% по сравнению с группой «контроль 1» и на 28% по сравнению с группой «контроль 2». Гесперетин при ишемии не влиял на АОА плазмы крови крыс.

**Таблица 4.10** – Влияние кверцетина и гесперетина на показатели ферментативной антиоксидантной защиты в мозге крыс при фокальной ишемии

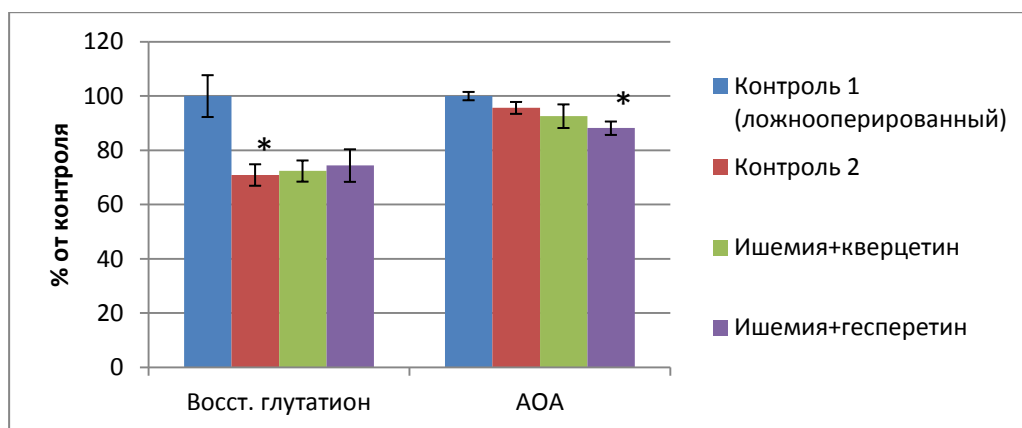
	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+ кверцетин	Ишемия+ гесперетин
Восст. глутатион (мМ/г ткани)	1,45±0,11	1,03±0,06*	1,05±0,06	1,08±0,09
АОА (мМ эквивалента Fe <sup>2+</sup> )	10,23±0,16	9,79±0,22	9,47±0,45	9,02±0,25*

\* - p<0,05 - по отношению к группе «контроль 1»

**Таблица 4.11** – Влияние кверцетина и гесперетина на общую антиоксидантную активность в плазме крови крыс при фокальной ишемии

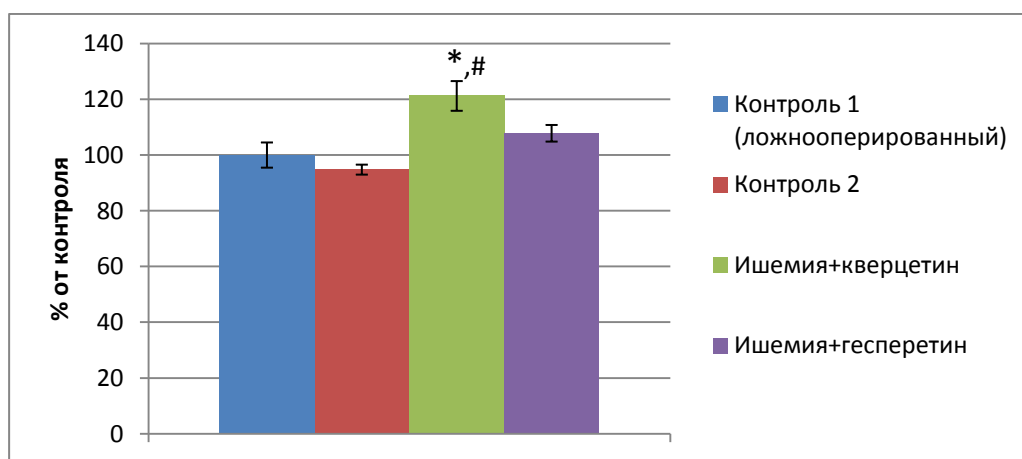
	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+ кверцетин	Ишемия+ гесперетин
АОА (мМ эквивалента Fe <sup>2+</sup> )	0,382±0,017	0,362±0,007	0,463±0,020*,#	0,412±0,011

\* - p<0,05 - по отношению к группе «контроль 1»; # - p<0,05 - по отношению к группе «контроль 2»



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.10** – Влияние кверцетина и гесперетина на показатели неферментативной антиоксидантной защиты в мозге крыс при фокальной ишемии



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

**Рисунок 4.11** – Влияние кверцетина и гесперетина на общую антиоксидантную активность в плазме крови крыс при фокальной ишемии

При изучении продуктов перекисного окисления липидов и белков, в мозге крыс, перенесших ишемию с реперфузией («контроль 2») было показано, что уровень МДА снижался на 30 % по сравнению с животными из контроля 1 (таблица 4.12, рисунок 4.12). Изменений в мозге уровней КПБ и изопростанов при ишемии обнаружено не было. В плазме крови ишемия головного мозга не влияла на уровень КПБ и МДА (таблица 4.13, рисунок 4.13).

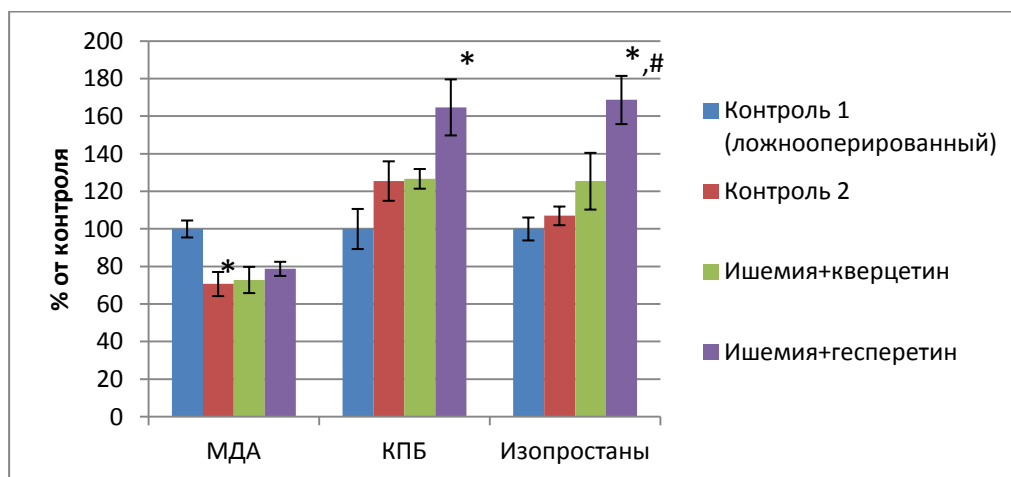
В мозге крыс, получавших гесперетин в составе пищевого рациона, на 64% увеличивался уровень КПБ по сравнению с животными из контроля 1, а также уровень изопростанов по сравнению с контролем 1 и контролем 2 на 68% и 58%,

соответственно. В плазме крови при приеме гесперетина также наблюдалось повышение уровня карбонильных производных белков по сравнению с контролем 1 и контролем 2 на 34% и 33%, соответственно. Для кверцетина значимых эффектов на уровень карбонильных производных белков и изопростанов обнаружено не было. Также не было обнаружено значимого влияния кверцетина и гесперетина на уровень МДА ни в мозге, ни в плазме крови.

**Таблица 4.12** – Влияние кверцетина и гесперетина на уровень продуктов перекисного окисления липидов и белков в мозге крыс при фокальной ишемии

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+ кверцетин	Ишемия+ гесперетин
МДА (нмоль/г)	120±5	85±8*	88±8	95±5
КПБ (нмоль/мг белка)	10,1±1,1	12,6±1,1	12,7±0,6	16,5±1,5*
Изопростаны (пг/мг ткани)	130±8	139±6	163±20	220±17*,#

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

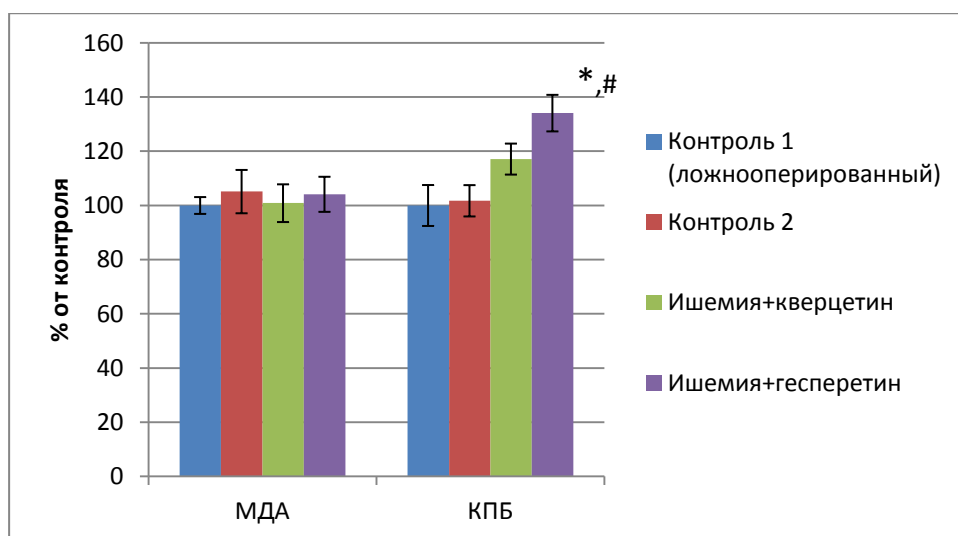
**Рисунок 4.12** – Влияние кверцетина и гесперетина на уровень продуктов перекисного окисления липидов и белков в мозге крыс при фокальной ишемии



**Таблица 4.13** – Влияние кверцетина и гесперетина на уровень продуктов перекисного окисления липидов и белков в плазме крови крыс при фокальной ишемии

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+ кверцетин	Ишемия+ гесперетин
МДА (нмоль/мл)	4,24±0,13	4,46±0,34	4,28±0,30	4,41±0,27
КПБ (нмоль/мг белка)	6,01±0,45	6,11±0,35	7,03±0,34	8,05±0,41 <sup>*,#</sup>

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

**Рисунок 4.13** – Влияние кверцетина и гесперетина на уровень продуктов перекисного окисления липидов и белков в плазме крови крыс при фокальной ишемии

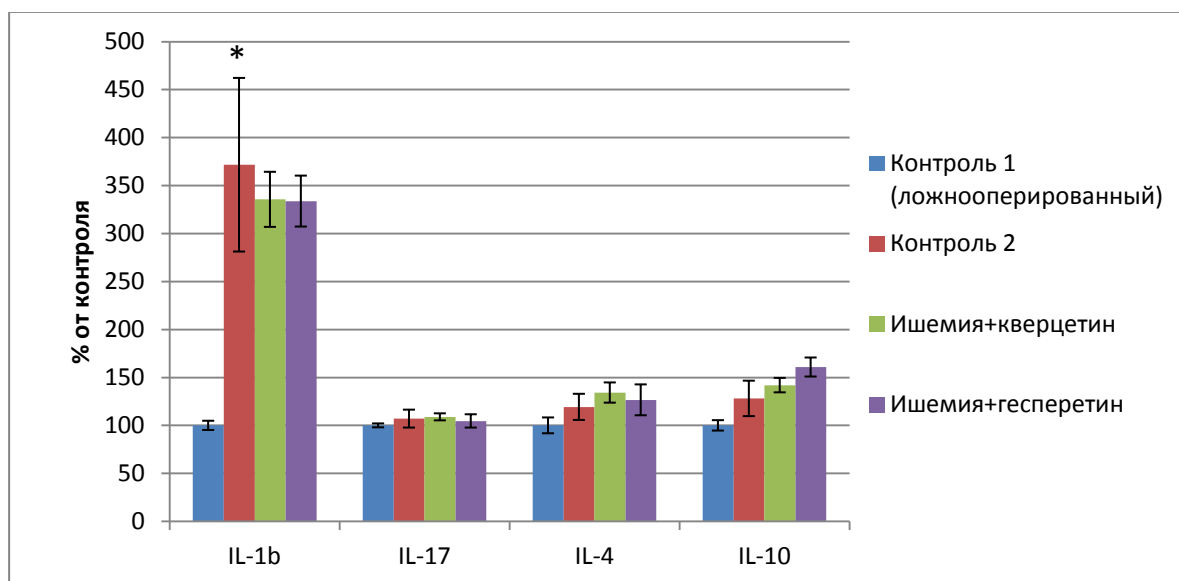
Ишемия вызывала увеличение в ткани мозга провоспалительного цитокина IL-1 на 272 % по сравнению с контролем 1. Влияния ишемии на уровень других цитокинов (IL-4, IL-10 и IL-17) отмечено не было (таблица 4.14, рисунок 4.14).

Ни кверцетин, ни гесперетин у крыс, перенесших 24 ч ишемию с реперфузией, не вызывали значимых изменений уровней исследуемых цитокинов.

**Таблица 4.14** – Влияние кверцетина и гесперетина на уровень про- и противовоспалительных цитокинов в мозге крыс при фокальной ишемии (пг/мг ткани)

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+ кверцетин	Ишемия+ гесперетин
IL-1b	0,39±0,02	1,44±0,35*	1,31±0,11	1,30±0,10
IL-17	1,15±0,02	1,23±0,11	1,25±0,04	1,20±0,08
IL-4	0,027±0,002	0,033±0,004	0,037±0,003	0,035±0,004
IL-10	0,91±0,10	1,16±0,17	1,29±0,07	1,46±0,09

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.14** – Влияние кверцетина и гесперетина на уровень про- и противовоспалительных цитокинов в мозге крыс при фокальной ишемии

Таким образом, исходя из полученных данных, можно заключить, что кверцетин и гесперетин значимо не влияют на процессы воспаления при ишемии мозга, а гесперетин, кроме того, обладает прооксидантной активностью. Однако, активность гесперетина в мозге, как прооксиданта, не согласуется с его влиянием на размер очага при ишемии. В связи с этим, в следующей серии экспериментов

нами было решено, измерить показатели ОС не во всём ишемизированном полушарии мозга, а непосредственно в его приочаговой зоне.

#### 4.2.3. Исследование действия карнозина и гесперетина на показатели окислительного стресса в приочаговой зоне коры мозга при фокальной ишемии-реперфузии

Результаты данного раздела представлены в работе [13].

В группе животных, перенесших ишемию с реперфузией, наблюдалось уменьшение активности СОД в приочаговой зоне коры головного мозга крыс на 21% и снижение резистентности ткани мозга к окислению на 49%, характеризующей уровень неферментативной эндогенной антиоксидантной системы защиты, по сравнению с животными группы «контроль 1». Также в данной зоне мозга в группе животных с фокальной ишемией на 29% увеличилась концентрация МДА, по сравнению с животными группы «контроль 1» (таблица 4.15, рисунок 4.15).

Гесперетин и карнозин значительно снижали концентрацию МДА в приочаговой зоне коры головного мозга (таблица 4.15, рисунок 4.15) по сравнению с контрольной группой животных с ишемией («контроль 2») на 31% и 23%, соответственно, приближая ее к уровню животных группы «контроль 1».

Включение гесперетина в рацион повышало активность СОД в приочаговой зоне коры головного мозга на 33%, также приближая ее к уровню животных группы «контроль 1». Включение в рацион карнозина не оказывало статистически значимого влияния на активность СОД в приочаговой зоне коры головного мозга.

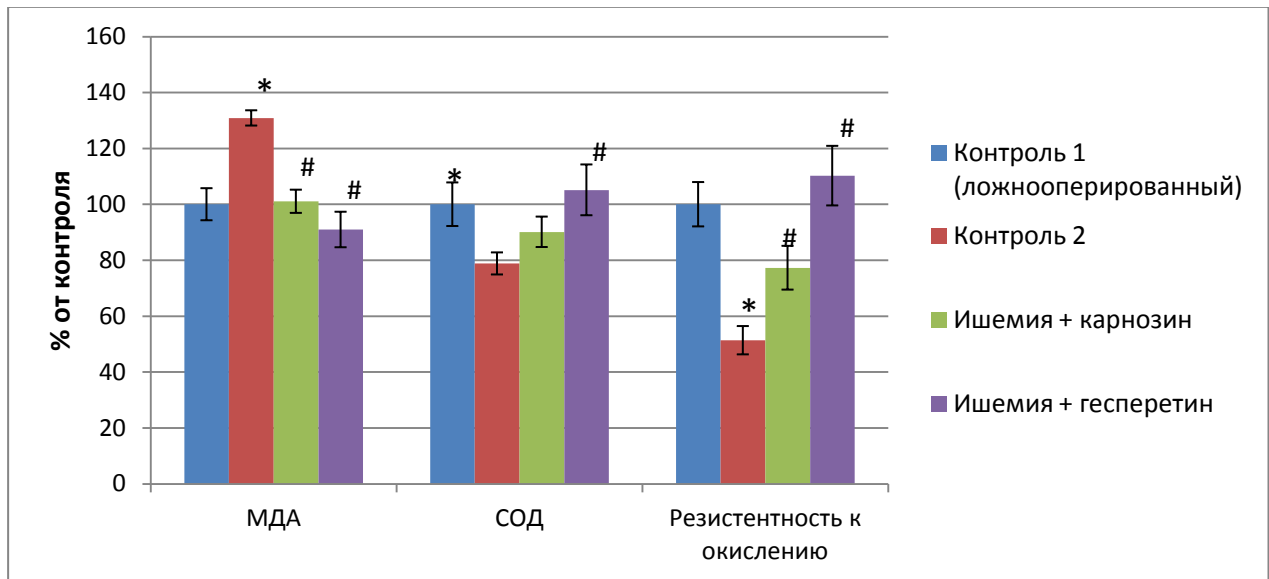
И карнозин, и гесперетин при ишемии повышали антиоксидантную активность приочаговой зоны коры мозга, что выражалось в увеличении резистентности к окислению на 51 % и на 115 % по сравнению с группой «контроль 2».

В зоне коры контралатерального полушария, симметричной приочаговой зоне, статистически значимых изменений измеряемых параметров выявлено не было (таблица 4.16, рисунок 4.16).

**Таблица 4.15** – Влияние карнозина и гесперетина на показатели антиоксидантной защиты и уровень МДА при фокальной ишемии в приочаговой зоне коры мозга крыс

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+ карнозин	Ишемия+ гесперетин
МДА (нмоль/г ткани)	127±7	166±3*	128±5 <sup>#</sup>	116±8 <sup>#</sup>
СОД (активность /(мин*мг белка))	4,28±0,33	3,37±0,17*	3,86±0,23	4,50±0,39 <sup>#</sup>
Резистентность к окислению (сек)	92,7±7,4	47,6±4,7	71,7±7,3 <sup>#</sup>	102,2±9,9 <sup>#</sup>

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

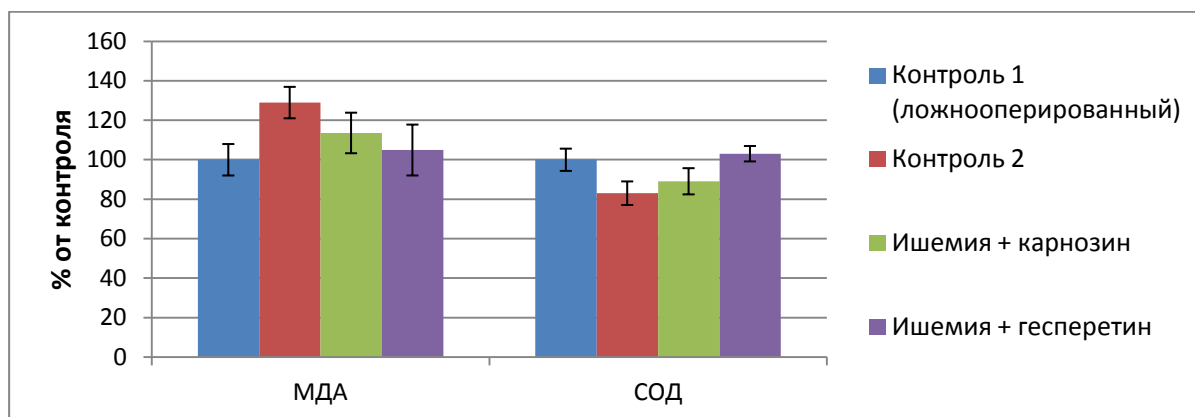


\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

**Рисунок 4.15** – Влияние карнозина и гесперетина на показатели антиоксидантной защиты и уровень МДА при фокальной ишемии в приочаговой зоне коры мозга крыс

**Таблица 4.16** – Влияние карнозина и гесперетина на показатели антиоксидантной защиты и уровень МДА при фокальной ишемии в коре контралатерального полушария мозга крыс

	Контроль 1 (ложнооперированный)	Контроль 2	Ишемия+ карнозин	Ишемия+ гесперетин
МДА (нмоль/г ткани)	115±9	148±9	131±12	121±14,85
СОД (активность /(мин*мг белка))	4,59±0,25	3,79±0,22	4,09±0,30	4,56±0,30



**Рисунок 4.16** – Влияние карнозина и гесперетина на показатели антиоксидантной защиты и уровень МДА при фокальной ишемии в коре контралатерального полушария мозга крыс

Таким образом, для обоих выявленных в данной работе нейропротекторов, карнозина и гесперетина, было показано прямое антиоксидантное действие, выражавшееся в снижении МДА и увеличении резистентности ткани мозга к окислению. Для гесперетина, помимо этого, показано увеличение активности СОД, относительно контроля с ишемией.

#### 4.2.4. Исследование действия карнозина на показатели окислительного стресса и апоптоза при необратимой фокальной ишемии

Результаты данного раздела представлены в работах [18, 28, 29].

При сопоставлении окислительного статуса исследуемых отделов мозга в группе животных «контроль 1» была обнаружена гетерогенность коры больших полушарий как по уровню накопленных липидных гидроперекисей (таблица 4.17, рисунок 4.17), так и по общей антиоксидантной активности (таблица 4.18, рисунок 4.18). В лобных долях обоих полушарий мозга у животных группы «контроль 1» уровень липидных гидроперекисей превышал значения для других отделов коры на 26% и в то же время общая антиоксидантная активность была выше, чем в других отделах, на 16%. При попарном сравнении других зон коры мозга (зоны очага некроза и приочаговой зоны) значимых различий по исследуемым параметрам выявлено не было.

В группе животных «контроль 2», по сравнению с группой «контроль 1» уровень липидных гидроперекисей в зоне ишемического очага некроза уменьшился на 15 %. В то же время, в приочаговой зоне (ишемической полутени) уровень липидных гидроперекисей существенно повышался (на 63 %).

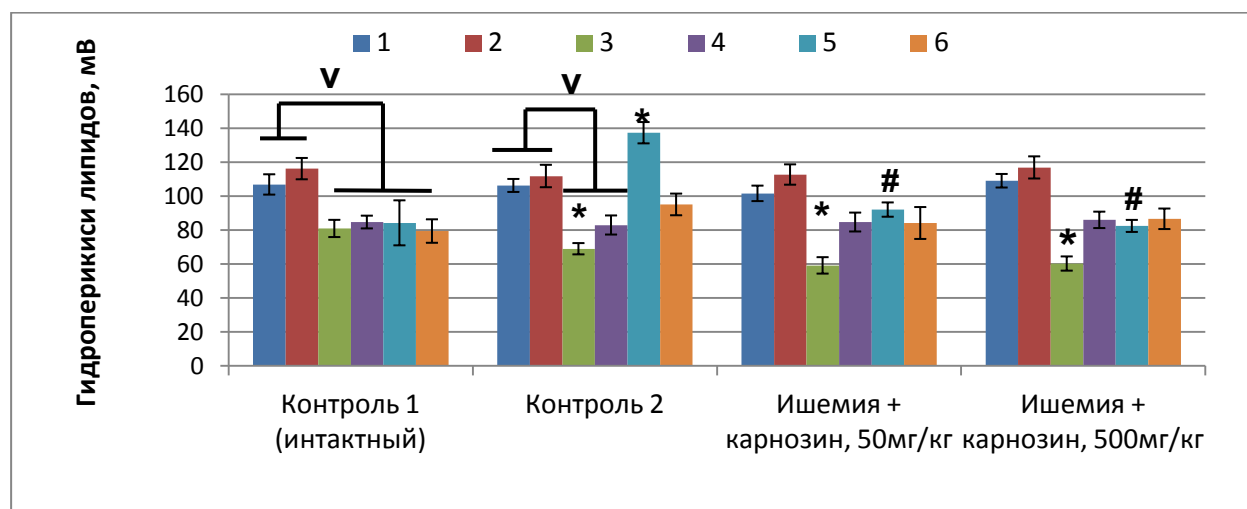
При исследовании соответствующих зон контралатерального полушария в условиях ишемии изменений уровня липидных гидроперекисей относительно животных группы «контроль 1» обнаружено не было.

Общая антиоксидантная активность ткани мозга у животных группы «контроль 2», перенесших фокальную ишемию, в приочаговой зоне достоверно снизилась на 36 % по сравнению с контролем 1. В других зонах коры как ипсилатерального и контралатерального полушария, в том числе в зоне ишемического очага, значимых изменений данного параметра по сравнению с контролем 1 отмечено не было. Отмеченное у животных группы «контроль 1» значимое превышение общей антиоксидантной активности в лобных долях сохранилось и при воздействии фокальной ишемии.

**Таблица 4.17** – Влияние карнозина на уровень гидроперекисей липидов при необратимой фокальной ишемии в различных зонах коры мозга крыс

	Контроль 1 (интактный)	Контроль 2	Ишемия+ карнозин, 50 мг/кг	Ишемия+ карнозин, 500 мг/кг
Левая лобная доля	106±4	106±6	102±4	109±5
Правая лобная доля	116±7	112±6	113±7	117±6
Ишемический очаг	80,9±4,2 <sup>v</sup>	68,9±5,1 <sup>v*</sup>	59,1±3,3 <sup>*</sup>	60,2±4,8 <sup>*</sup>
Зона, симметричная очагу	84,7±4,8 <sup>v</sup>	82,9±3,8 <sup>v</sup>	84,7±5,6	85,5±6,0
Приочаговая зона	84,2±3,5 <sup>v</sup>	137,3±13,3 <sup>*</sup>	92,0±6,3 <sup>#</sup>	82,4±4,2 <sup>#</sup>
Зона, симметричная приочаговой	79,4±6,1 <sup>v</sup>	95,3±6,9	84,1±6,4	86,6±9,4

v - p<0.05 по сравнению с лобными долями; \* - p<0,05 - по отношению к группе «контроль 1»; # - p<0,05 - по отношению к группе «контроль 2»



1 - левая лобная доля; 2 - правая лобная доля; 3 - ишемический очаг; 4 - зона, симметричная очагу; 5 - приочаговая зона; 6 - зона, симметричная приочаговой  
\* - p<0,05 - по отношению к группе «контроль 1»; # - p<0,05 - по отношению к группе «контроль 2»

**Рисунок 4.17** – Влияние карнозина на уровень гидроперекисей липидов при необратимой фокальной ишемии в различных зонах коры мозга крыс

Карнозин в обеих дозах (50 и 500 мг/кг м.т. в сутки) приводил к почти одинаковому снижению уровня липидных гидроперекисей в приочаговой зоне коры головного мозга на 33 и 40% соответственно. В то же время наблюдалось

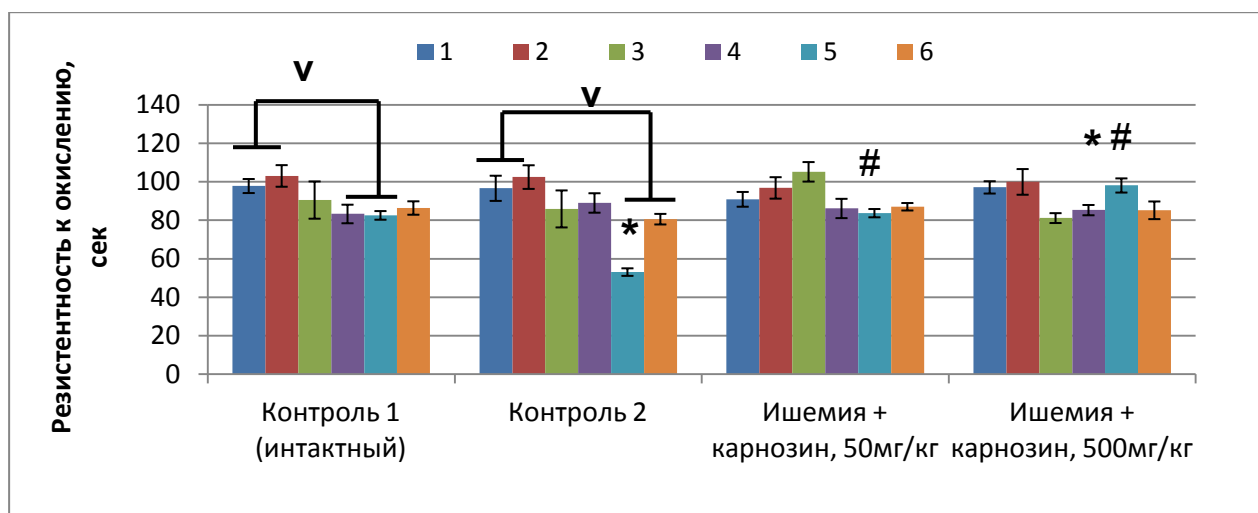
его дозозависимое влияние на резистентность ткани к окислению в приочаговой зоне ишемизированного полушария. Карнозин в дозе 50 мг/кг увеличивал ее на 58% от ишемического контроля, восстанавливая до значений животных группы «контроль 1», а при введении в дозе 500 мг/кг антиоксидантная активность возрастала на 85%, значимо превышая показатели группы группы «контроль 1». В других зонах, в которых на фоне ишемии не отмечалось изменений резистентности ткани к окислению, эффект карнозина не выявлялся.

**Таблица 4.18** – Влияние карнозина на резистентность ткани к окислению при необратимой фокальной ишемии в различных зонах коры мозга крыс

	Контроль 1 (интактный)	Контроль 2	Ишемия+ карнозин, 50 мг/кг	Ишемия+ карнозин, 500 мг/кг
Левая лобная доля	97,9±3,8	96,7±3,2	90,9±3,6	97,1±3,6
Правая лобная доля	103±6	103±7	97±6	100±6
Ишемический очаг	90,6±2,6	86,0±9,7	105,2±9,62	81,2±5,1
Зона, симметричная очагу	83,3±2,7 <sup>v</sup>	89,1±4,9	86,2±5,1	85,3±5,0
Приочаговая зона	82,6±3,7 <sup>v</sup>	53,1±2,3 <sup>v*</sup>	83,8±2,0 <sup>#</sup>	98,1±2,2 <sup>*#</sup>
Зона, симметричная приочаговой	86,4±4,6	80,6±3,5 <sup>v</sup>	87,1±2,8	85,2±1,9

<sup>v</sup> -  $p < 0,05$  по сравнению с лобными долями; \* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»





1 - левая лобная доля; 2 - правая лобная доля; 3 - ишемический очаг; 4 - зона, симметричная очагу; 5 - приочаговая зона; 6 - зона, симметричная приочаговой  
 v -  $p < 0.05$  по сравнению с лобными долями; \* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

**Рисунок 4.18** – Влияние карнозина на резистентность ткани к окислению при необратимой фокальной ишемии в различных зонах коры мозга крыс

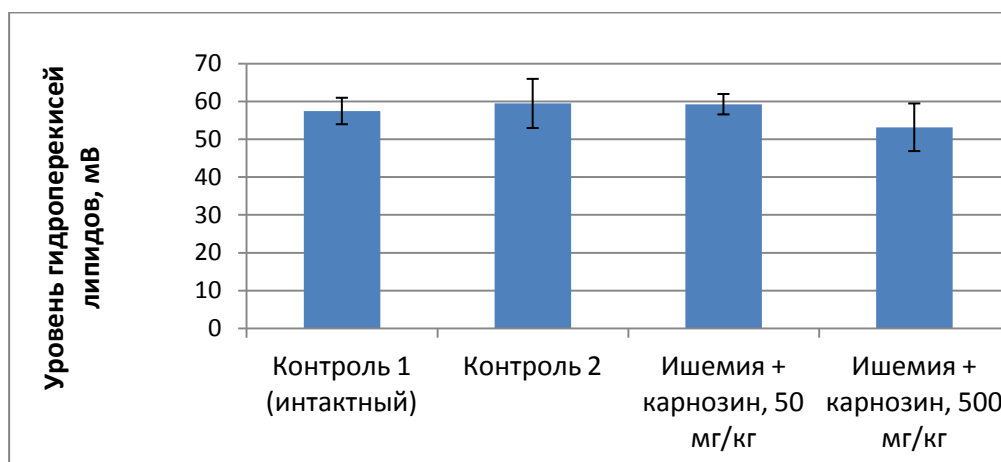
В плазме крови животных с необратимой ишемией («контроль 2») уровень липидных гидроперекисей не превышал значений у крыс из контроля 1 (таблица 4.19, рисунок 4.19). Введение карнозина, независимо от экспериментальной дозы препарата, не оказывало влияния на этот параметр. В то же время общая антиоксидантная активность плазмы крови в группе «контроль 2» значительно снижалась относительно крыс из контроля 1 (таблица 4.19, рисунок 4.20). Введение карнозина как в дозе 50 мг/кг, так и 500 мг/кг массы тела в сутки приводило к повышению резистентности плазмы крови к окислению, по сравнению с группой «контроль 2» на 62% и 102%, соответственно.

При этом в группе животных, получавших карнозин в дозе 500 мг/кг массы тела в сутки, уровень резистентности плазмы крови к окислению был сопоставим со значениями у крыс из контроля 1. Таким образом, действие карнозина проявлялось только в условиях нарушения эндогенной антиоксидантной системы.

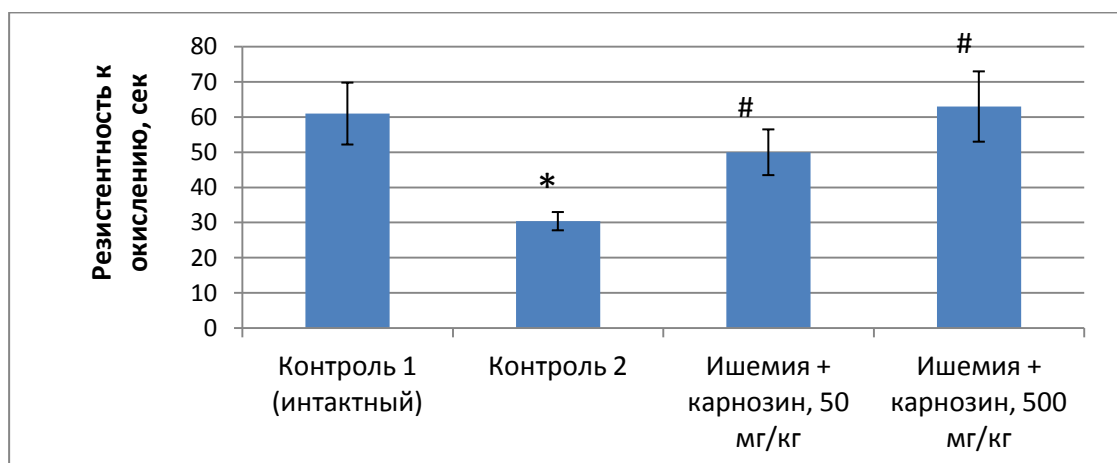
**Таблица 4.19** – Влияние карнозина на уровень гидроперекисей липидов и резистентность ткани к окислению при необратимой фокальной ишемии в плазме крови крыс

	Контроль 1 (интактный)	Контроль 2	Ишемия+ карнозин 50 мг/кг	Ишемия+ карнозин 500 мг/кг
Гидроперекиси липидов	57,5±3,5	59,5±6,5	59,3±2,7	53,2±6,3
Резистентность к окислению	61,0±8,8	30,4±2,6*	50,0±6,5#	63,0±10,0#

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»



**Рисунок 4.19** – Влияние карнозина на уровень гидроперекисей липидов при необратимой фокальной ишемии в плазме крови крыс



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»

**Рисунок 4.20** – Влияние карнозина на резистентность ткани к окислению при необратимой фокальной ишемии в плазме крови крыс

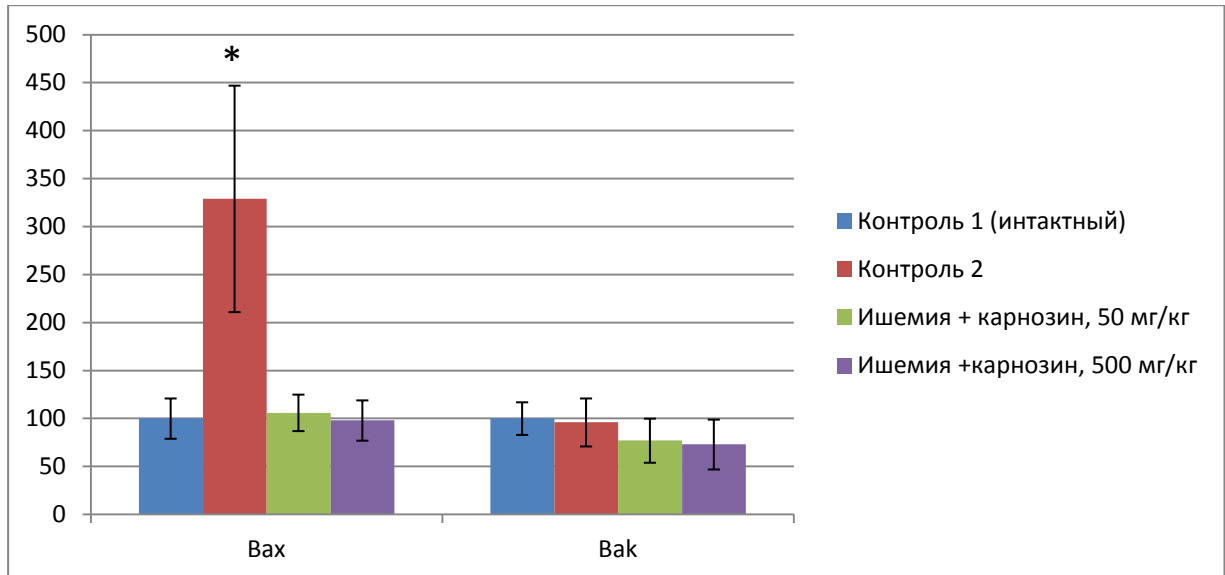
При изучении белков семейства Bcl-2, регулирующих митохондриальный путь апоптоза при ишемии мозга [94, 106, 188], было показано, что в ипсилатеральном полушарии при ишемии увеличивалось относительное количество как Bax (на 230%), так и Bcl-2 (на 120%) относительно животных группы «контроль 1», при этом соотношение этих белков смещалось в сторону проапоптотического сигнала (таблица 4.20, рисунок 4.21, 4.22).

В использованной модели карнозин в дозах 50 мг/кг и 500 мг/кг массы тела восстанавливал в приочаговой зоне соотношение данных белков, препятствующее развитию апоптоза. Введение карнозина в постишемическом периоде не повлияло на уровень проапоптотического белка Bax и антиапоптотических белков Bcl-xL и Bcl-w в приочаговой зоне и в симметричном участке коры контралатерального полушария.

**Таблица 4.20** – Влияние карнозина на уровень про- и антиапоптотических белков при необратимой фокальной ишемии в приочаговой зоне коры мозга крыс (% от контроля)

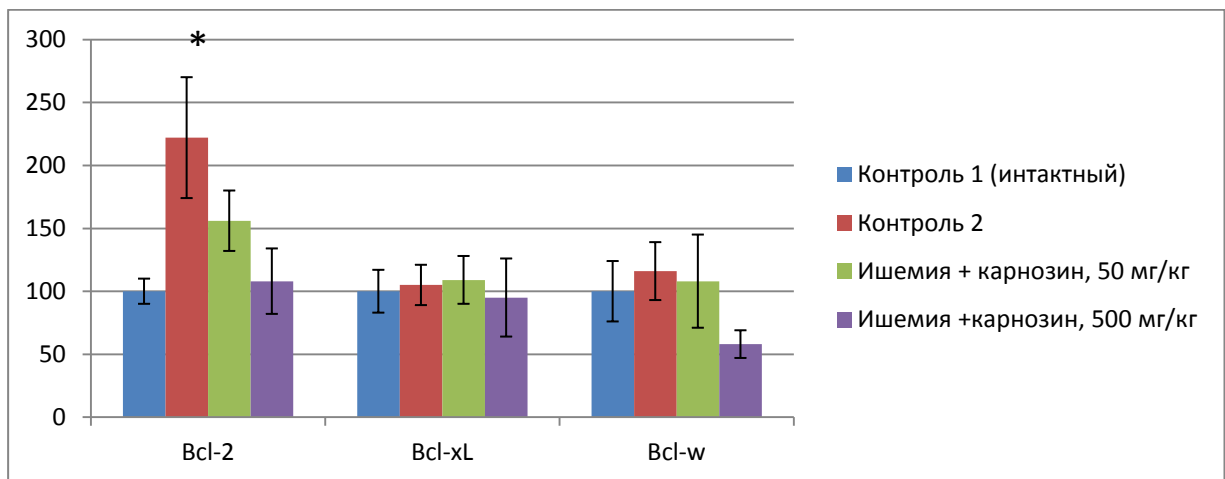
	Контроль 1 (интактный)	Контроль 2	Ишемия+ карнозин 50, мг/кг	Ишемия+ карнозин 500, мг/кг
Bax	100±21	329±118*	106±19	98±21
Bak	100±17	96±25	77±23	73±26
Bcl-2	100±10	222±48*	156±24	108±26
Bcl-xL	100±17	105±16	109±19	95±31
Bcl-w	100±24	116±23	108±37	58±11

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.21** – Влияние карнозина на уровень проапоптотических белков при необратимой фокальной ишемии в приочаговой зоне коры мозга крыс



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

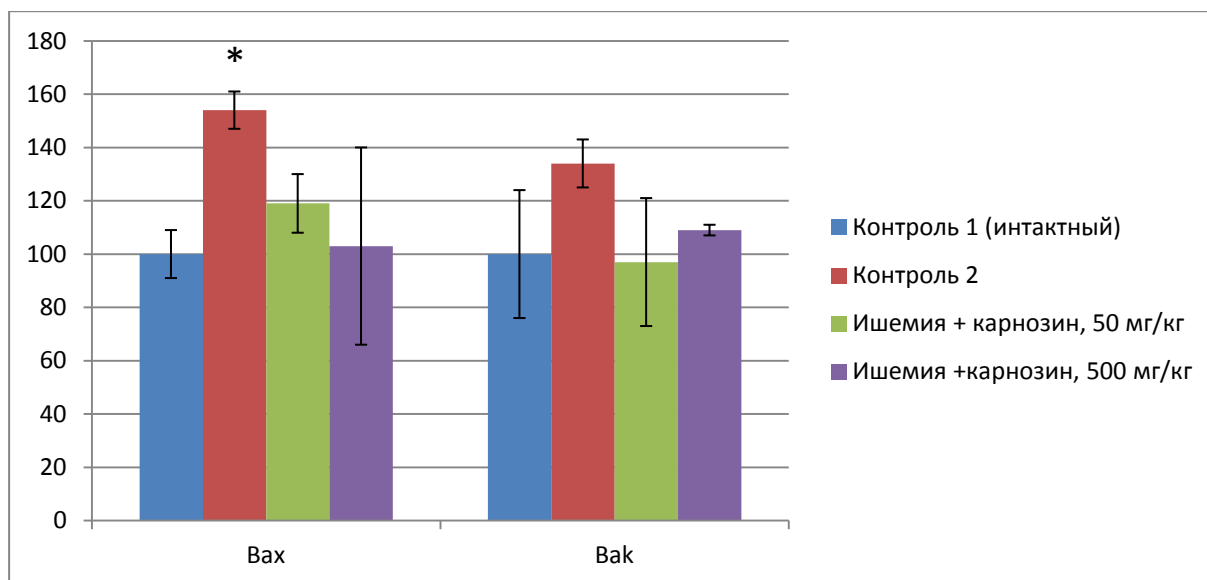
**Рисунок 4.22** – Влияние карнозина на уровень антиапоптотических белков при необратимой фокальной ишемии в приочаговой зоне коры мозга крыс

В контралатеральном полушарии также наблюдался рост относительного количества как Вах, так и Bcl-2, но при этом соотношение Bcl-2/Вах изменялось в пользу антиапоптотического сигнала (таблица 4.21, рисунок 4.23, 4.24).

**Таблица 4.21** – Влияние карнозина на уровень про- и антиапоптотических белков при необратимой фокальной ишемии в коре контралатерального полушария мозга крыс (% от контроля)

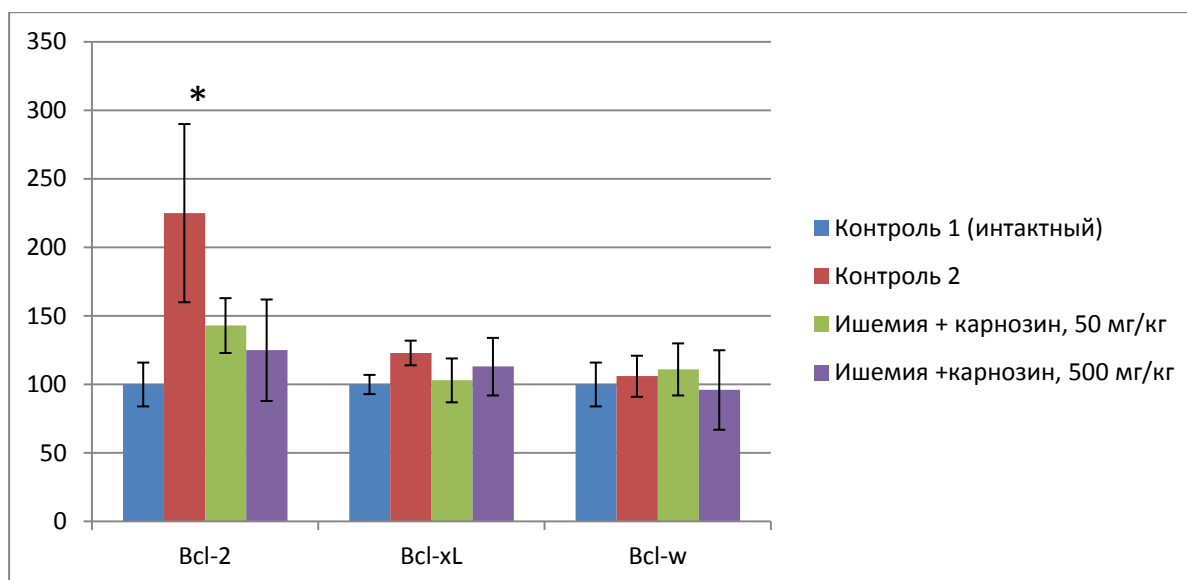
	Контроль 1 (интактный)	Контроль 2	Ишемия+ карнозин 50 мг/кг	Ишемия+ карнозин 500 мг/кг
Вах	100±9	154±7*	119±11	103±37
Вак	100±24	134±9	97±24	109±2
Bcl-2	100±16	225±65*	143±20	125±37
Bcl-xL	100±7	123±9	103±16	113±21
Bcl-w	100±16	106±15	111±19	96±29

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.23** – Влияние карнозина на уровень проапоптотических белков при необратимой фокальной ишемии в коре контралатерального полушария мозга крыс



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.24** – Влияние карнозина на уровень антиапоптотических белков при необратимой фокальной ишемии в коре контралатерального полушария мозга крыс

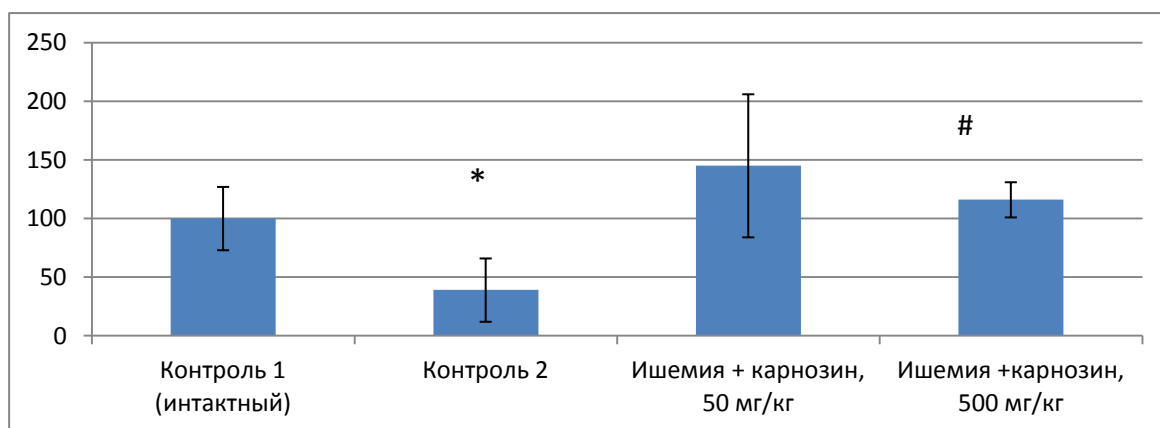
Необратимая ишемия вызывала существенное уменьшение активации Akt-киназы, связанной с поддержанием жизнеспособности нейронов [64, 162], в приочаговой зоне коры мозга на 60 % относительно контроля 1 (таблица 4.22, рисунок 4.25). В коре контралатерального полушария мозга ишемия не вызывала значимых изменений Akt-киназы (таблица 4.23, рисунок 4.27). Ишемия вызывала повышение активности киназы ERK1/2 относительно контроля 1 на 280% в приочаговой зоне (таблица 4.22, рисунок 4.26), и на 150% в контралатеральном полушарии (таблица 4.23, рисунок 4.28). При этом, ишемия не оказывала значимого влияния на активность двух других исследованных MAP-киназ: p38 и JNK.

Карнозин приводил к увеличению активации киназы Akt в приочаговой зоне до уровня интактных животных. При этом карнозин не оказывал значимого влияния на уровень активации MAP-киназ: ERK1/2, p38 и JNK.

**Таблица 4.22** – Влияние карнозина на уровень активации киназы Akt и MAP-киназ при необратимой фокальной ишемии в приочаговой зоне коры мозга крыс (% от контроля)

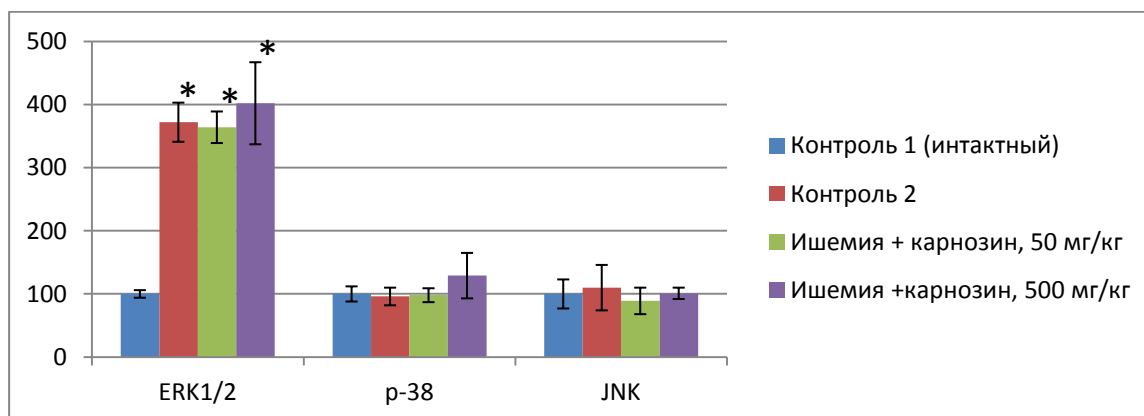
	Контроль 1 (интактный)	Контроль 2	Ишемия+ карнозин, 50 мг/кг	Ишемия+ карнозин, 500 мг/кг
Akt	100±27	39±27*	145±61	116±15 <sup>#</sup>
ERK1/2	100±6	372±31*	364±25*	402±65*
p-38	100±12	96±14	98±11	129±36
JNK	100±23	110±36	89±21	101±9

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2»



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»; # -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 2».

**Рисунок 4.25** – Влияние карнозина на уровень активации киназы Akt при необратимой фокальной ишемии в приочаговой зоне коры мозга крыс



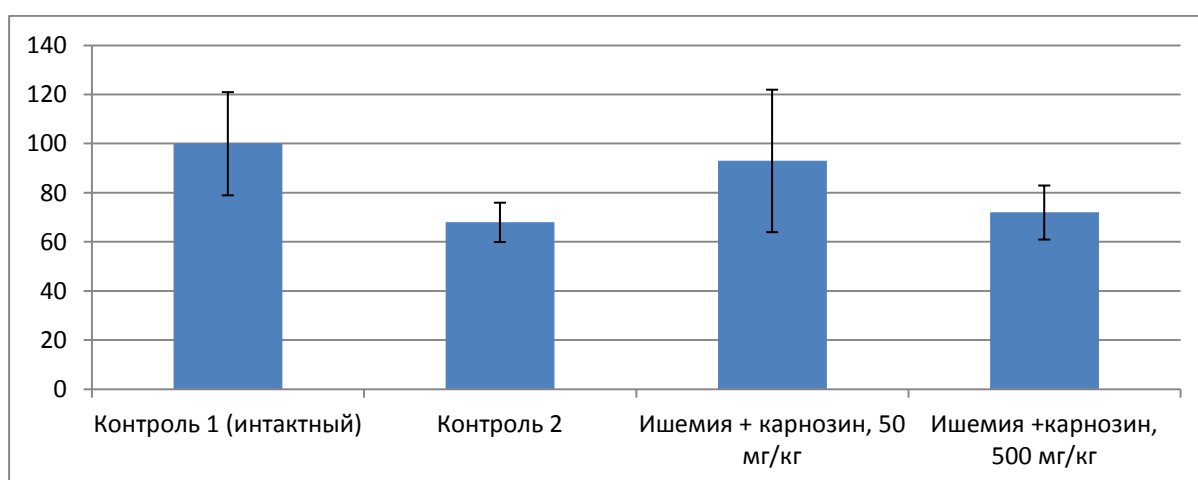
\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.26** – Влияние карнозина на уровень активации MAP-киназ при необратимой фокальной ишемии в приочаговой зоне коры мозга крыс

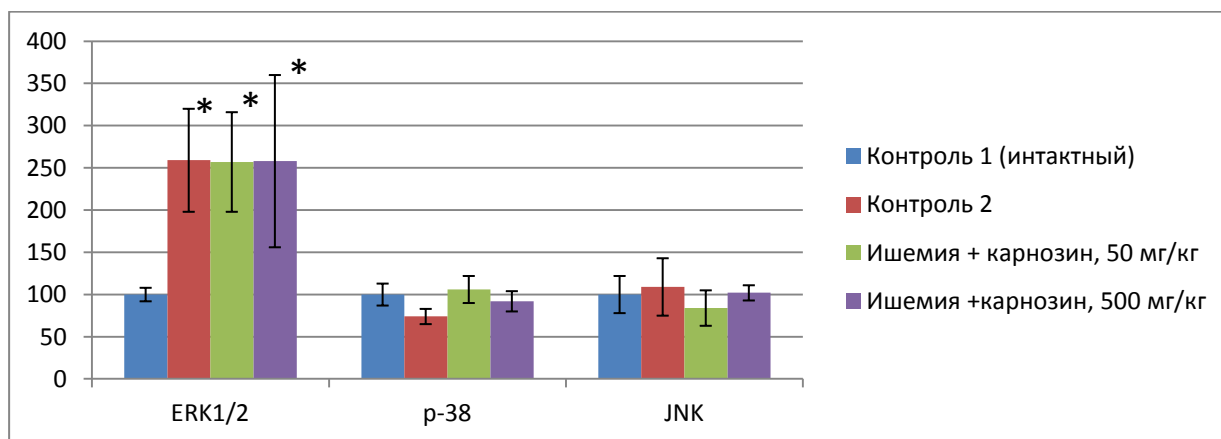
**Таблица 4.23** – Влияние карнозина на уровень активации киназы Akt и MAP-киназ при необратимой фокальной ишемии в коре контралатерального полушария мозга крыс (% от контроля)

	Контроль 1 (интактный)	Контроль 2	Ишемия+ карнозин, 50 мг/кг	Ишемия+ карнозин, 500 мг/кг
Akt	100±21	68±8	93±29	72±11
ERK1/2	100±8	259±61*	257±59*	258±102*
p-38	100±13	74±9	106±16	92±12
JNK	100±22	109±34	84±21	102±9

\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»



**Рисунок 4.27** – Влияние карнозина на уровень активации киназы Akt при необратимой фокальной ишемии в коре контралатерального полушария мозга крыс



\* -  $p < 0,05$  - по отношению к группе «контроль 1»

**Рисунок 4.28** – Влияние карнозина на уровень активации MAP-киназ при необратимой фокальной ишемии в коре контралатерального полушария мозга крыс



Таким образом, можно заключить, что нейропротекторная эффективность карнозина при фокальной ишемии мозга связана с его прямой антиоксидантной активностью, а так же с его способностью препятствовать изменению соотношения про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, в особенности Bax и Bcl-2, а также уменьшению активации киназы Akt, регулирующей соотношение и активность данных белков.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа была выполнена на двух моделях фокальной ишемии мозга: обратимой по методу [161] и необратимой по методу [70]. Были изучены активности карнозина, кверцетина и гесперетина при их предварительном добавлении в рацион крыс линии Вистар в течение 7 дней, на модели 60 мин обратимой фокальной ишемии с 24 ч реперфузией. Для карнозина также было исследовано его действие при постишемическом внутрибрюшинном введении на модели 72 ч необратимой фокальной ишемии у крыс. Действие карнозина, а также кверцетина и гесперетина при предварительном введении в качестве добавки к рациону на модели фокальной ишемии/реперфузии в данной работе исследовано впервые.

На модели фокальной ишемии с реперфузией, при измерении активности ферментов антиоксидантной защиты во всём ишемизированном полушарии, ишемия вызывала увеличение активности СОД и ГТ. При этом, в приочаговой зоне коры мозга активность СОД при ишемии наоборот падала относительно ложнооперированных животных. При оценке показателей неферментативной антиоксидантной защиты в мозге было показано, что ишемия вызывала снижение антиоксидантной активности (АОА, резистентность к окислению) и восстановленного глутатиона относительно контроля 1. При изучении продуктов перекисного окисления липидов и белков в ишемизированном полушарии крыс, было показано снижение уровней МДА и гидроперекисей липидов по сравнению с контролем 1. Вместе с тем, уровень МДА в приочаговой зоне коры головного мозга увеличивался относительно ложнооперированных животных. Изменений в мозге уровней КПБ и изопростанов при ишемии обнаружено не было. При изучении уровней цитокинов в мозге при ишемии было показано, что ишемия вызывала увеличение в ткани мозга провоспалительного цитокина IL-1 по сравнению с ложнооперированными животными. Влияния ишемии на уровень других цитокинов (IL-4, IL-10 и IL-17) отмечено не было.

В плазме крови животных, ишемия с реперфузией не вызывала значимых изменений активности ферментов АОЗ и не влияла на антиоксидантную активность относительно контроля 1. Также в плазме крови у животных после ишемии не отличались от уровней контроля 1 уровни гидроперекисей липидов, МДА и КПБ.

Согласно литературным данным, увеличение активности ферментов антиоксидантной защиты трактуется как компенсаторный ответ на продукцию большого количества радикалов, обусловленных ОС [37]. В исследовании [171] на аналогичной модели ишемии-реперфузии было показано, что экспрессия СОД в мозге, в зависимости от изоформы, может увеличиваться уже через 3 часа после начала ишемии, и оставаться повышенной до 3 дней. При этом показано, что увеличение экспрессии СОД может регистрироваться в зонах ткани, где регистрируются поврежденные и погибшие нейроны, то есть в зоне некроза. СОД и ГТ имеют общий путь регуляции через редокс-чувствительный транскрипционный фактор Nrf2, который повышает их экспрессию в ответ на повышение уровня свободных радикалов [163]. Вместе с тем, слишком высокий уровень продукции свободных радикалов вызывает угнетение их активности [164]. Таким образом, разнонаправленность изменений активности СОД во всём ишемизированном полушарии и в приочаговой зоне коры мозга при ишемии может быть объяснена тем, что в зависимости от удалённости ткани мозга от ишемического очага, ОС в ней развивается с разной интенсивностью, а также с разной скоростью. Так в зоне очага имеется два пика генерации свободных радикалов. Первый пик наблюдается в течение первых нескольких часов, и связан с кислородным взрывом при реперфузии. После этого генерация свободных радикалов снижается ниже уровня здоровой ткани, а затем, через несколько дней, снова возрастает, что связано с процессами воспаления. В зоне, прилежащей к очагу некроза, имеется лишь один пик, развивающийся в период от нескольких часов до суток [173]. С увеличением расстояния от очага некроза интенсивность этого пика падает. Таким образом, снижение активности СОД в приочаговой зоне мозга может быть объяснено угнетением ее активности под действием свободных

радикалов [164]. Вместе с тем, в зонах, где интенсивность окислительного стресса либо уменьшилась, либо не достигла высоких значений, активность СОД наоборот увеличивается в рамках компенсаторного ответа [37]. Аналогично может объясняться разной интенсивностью, а также скоростью развития ОС в отделах мозга при ишемии разнонаправленность в изменении уровня МДА между всем ишемизированным полушарием и приочаговой зоной коры мозга [173].

Снижение неферментативной АОА, а также резистентности к окислению ткани мозга при ишемии свидетельствует об истощении эндогенных антиоксидантов вследствие развития ОС [88, 138]. Снижение уровня восстановленного глутатиона у крыс, перенесших ишемию с реперфузией, согласуется с общими представлениями в литературе об истощении восстановительных эквивалентов при ишемии [38], а также согласуется с повышенной активностью глутатионтрансферазы.

На модели необратимой фокальной ишемии в данной работе впервые были исследованы процессы ОС в разных участках коры головного мозга.

У интактных животных в лобных долях коры мозга был обнаружен повышенный уровень липидных гидроперекисей и общая антиоксидантная активность относительно других отделов коры, что делает данный участок коры неприменимым в качестве контроля для изучения биохимических параметров в мозге при ишемии. Необратимая ишемия снижала уровень липидных гидроперекисей в зоне ишемического очага некроза, но в то же время повышала его приочаговой зоне (ишемической полутени) по сравнению аналогичными участками коры интактных животных. При изучении белков апоптоза при необратимой ишемии мозга, было показано увеличение относительного количества белков Вах и Bcl-2 относительно интактных животных как в ипсилатеральном, так и в контралатеральном полушарии. При этом, в ипсилатеральном полушарии соотношение этих белков смещалось в сторону проапоптотического сигнала, тогда как в контралатеральном полушарии - в пользу антиапоптотического сигнала. Также необратимая ишемия вызывала существенное уменьшение активации Akt-киназы, связанной с поддержанием

жизнеспособности нейронов [64, 162], в приочаговой зоне коры мозга, но не в контралатеральном полушарии. Кроме того, ишемия вызывала повышение активности киназы ERK1/2 в приочаговой зоне и в контралатеральном полушарии. При этом, ишемия не оказывала значимого влияния на активность двух других исследованных MAP-киназ: p38 и JNK.

В литературе известны только отдельные работы, в которых показаны отличия окислительного статуса между разными структурами мозга [49, 183]. Однако прямое сопоставление разных отделов коры в рамках данной работы проведено впервые [29]. Полученные данные об отличии окислительного статуса лобных долей интактных животных от остальных зон коры мозга коррелируют с данными работы [183] о повышенном содержании восстановленного глутатиона как компонента антиоксидантной защиты так, с другой стороны, малонового диальдегида (МДА) и пероксида водорода в лобной доле по сравнению с височной долей коры больших полушарий. Снижение уровня липидных гидроперекисей в ишемическом очаге с их одновременным ростом в приочаговой зоне можно объяснить результатами работы [173], в которой показано, что в зоне очага некроза через 24 часа после фокальной ишемии наблюдалось снижение продукции супероксид радикала, в то время как в зоне ишемической полутени его уровень был высоким [29].

Результаты исследования белков апоптоза в контралатеральном полушарии показывают, что если изменение антиоксидантного статуса в использованной модели необратимой фокальной ишемии ограничивалось только приочаговой зоной ткани мозга, то изменение профиля белков апоптоза носило более глобальный характер, распространяясь и на контралатеральное полушарие.

Предварительное введение карнозина в течение 7 дней при моделировании фокальной ишемии с последующей реперфузией выявило его прямое нейропротекторное действие, что выражалось в уменьшении площади ишемического очага в мозге экспериментальных животных. При необратимой фокальной ишемии для карнозина показано нейропротекторное действие сравнительно низких доз (50 и 500 мг/кг м.т в сутки). Важно отметить, что данные

дозы оказывали положительное действие при введении карнозина в постишемический период.

Значимого влияния карнозина на активность ферментов АОЗ не было отмечено ни при измерении во всём полушарии, ни при измерении в приочаговой зоне коры мозга. Карнозин как при необратимой фокальной ишемии, так и при ишемии-реперфузии, снижал уровень продуктов ПОЛ и увеличивал резистентность к окислению в мозге. При исследовании различных зон коры мозга при ишемии было показано, что действие карнозина на показатели ОС ограничено исключительно приочаговой зоной. При этом, если изменение резистентности ткани мозга к окислению под действием карнозина носило дозозависимый характер, то уровень гидроперекисей липидов одинаково снижался как при действии высокой дозы карнозина (500 мг/кг м.т.), так и при низкой (50 мг/кг м.т.). Значимого влияния на уровень цитокинов в мозге при ишемии под действием карнозина обнаружено не было. Карнозин нормализовал в приочаговой зоне коры мозга соотношение белков семейства Bcl-2, и приводил к увеличению активации киназы Akt, в приочаговой зоне до уровня интактных животных. При этом карнозин не оказывал значимого влияния на уровень активации MAP-киназ: ERK1/2, p38 и JNK.

Карнозин в плазме крови не влиял на активность ферментов АОЗ и не приводил к значимым изменениям уровней ПОЛ. При этом, карнозин увеличивал антиоксидантную активность плазмы крови.

Исследования карнозина на моделях фокальной ишемии при других способах введения суммированы в обзоре [82]. В частности, в работе [197] на модели постоянной фокальной ишемии у мышей, карнозин при его разовом внутрибрюшинном введении за 30 минут до ишемии в дозах 500 и 1000 мг/кг м.т., уменьшал размер ишемического очага через 24 ч после начала ишемии. При постишемическом введении, карнозин снижал размер очага в дозе начального введения 1000 мг/кг м.т. через 2 ч после начала ишемии и последующими введениями в дозах 500 мг/кг м.т. через каждые 6 ч. в течение суток от начала ишемии. В настоящей работе было показано нейропротекторное действие

карнозина при постишемическом введении в дозе 500 мг/кг м.т, но доза первого введения также составляла 500 мг/кг, поэтому и общая суточная доза карнозина была существенно ниже. В работе [46] на модели временной 3 ч фокальной ишемии у крыс с последующей 21 ч реперфузией, карнозин при его внутривенном введении одновременно с началом реперфузии, снижал площадь ишемического очага в дозах 1000 и 2000 мг/кг м.т. но не в дозе 500 мг/кг м.т. В литературе имеются данные о нейропротекторном действии карнозина при его профилактическом введении в такой же дозе, которая была использована в настоящей работе - 150 мг/кг м.т. в сут [211], однако они получены на модели глобальной ишемии. Таким образом использованные в данном исследовании дозы ниже эффективных доз, исследованных в литературе на моделях фокальной ишемии, которые начинаются от 500 мг/кг м.т. и выше [82].

Отсутствие значимого влияния карнозина на активность ферментов АОЗ при ишемии не противоречит литературным данным. В исследовании [58] на нейрональной культуре клеток мозжечка было показано увеличение мРНК СОД под действием карнозина в концентрации 5 мМ. При этом, в исследовании [190] на модели необратимой фокальной ишемии стимулирующее действие карнозина на активность СОД проявлялось при дозах введения, начиная от 250 мг/кг м.т., что почти в 2 раза выше дозы, использованной в настоящей работе.

Повышение антиоксидантной активности приочаговой зоны мозга у крыс, получавших карнозин, может объясняться его способностью предотвращать развитие ОС за счет прямого антиоксидантного действия [6] и, соответственно, предотвращать окисление эндогенных антиоксидантов в мозге. Кроме того, карнозин может сам повышать антиоксидантную активность при проникновении в мозг.

Снижение под действием карнозина содержания продуктов перекисного окисления липидов в ткани мозга животных с фокальной ишемией может быть обусловлено как способностью карнозина связывать продукты окислительных превращений липидов [156], так и его способностью напрямую взаимодействовать с активными формами кислорода [109]. Также карнозин может

препятствовать образованию более активных форм кислорода за счёт того, что он является внутриклеточным подвижным буфером протонов и за счёт этого может препятствовать гиперполяризации [57].

В литературе имеются данные о влиянии карнозина на процессы воспаления. Считается, что за иммуномодулирующее действие карнозина ответственен так называемый карнозин-гистидин-гистаминовый путь, в ходе которого из карнозина образуется гистидин, преобразующийся в гистамин, который и оказывает иммуномодулирующее действие через гистаминовые рецепторы H1-H3 [125], в частности, подавляя продукцию IL-1 и стимулируя продукцию IL-10 [216]. Однако по некоторым данным, в мозге у крыс при фокальной ишемии данный путь не оказывает значимого влияния на воспалительный ответ [125], что может объяснять отсутствие иммуномодулирующего действия карнозина в данной работе [12].

Влияние карнозина на белки семейства Bcl-2 и апоптотические киназы в данной работе изучено впервые. Регуляция карнозином баланса про- и антиапоптотических белков может осуществляться через уменьшение продукции свободнорадикальных соединений, запускающих внутри клеток киназные каскады.

Введение гесперетина в течение 7 дней перед фокальной ишемией с последующей реперфузией привело к уменьшению площади ишемического очага в мозге экспериментальных животных, что говорит о его прямом нейропротекторном действии.

Гесперетин при ишемии повышал активность СОД в приочаговой зоне коры мозга, приближая её к уровню контроля 1, но не влиял на активность ферментов АОЗ при их измерении во всём ишемизированном полушарии. Гесперетин в мозге животных с ишемией повышал антиоксидантную активность, приближая её к значениям контроля 1. При этом, гесперетин в мозге не влиял на уровень восстановленного глутатиона. Также гесперетин значительно снижал концентрацию МДА в приочаговой зоне коры головного мозга и не оказывал значимого влияния на уровень цитокинов в мозге.



В плазме крови гесперетин вызывал значимое снижение активности СОД, но не влиял антиоксидантную активность плазмы, относительно животных с ишемией. Также гесперетин при ишемии в плазме крови повышал уровень КПБ, но не влиял значимо на уровень МДА.

Для гесперетина в литературе показано нейропротекторное действие при его пероральном профилактическом введении в течение 7 дней в дозах 50 и 100 мг/кг м.т. в сут. на модели глобальной ишемии [101]. В настоящей работе была также использована доза 50 мг/кг м.т. и такое же время введения, из чего можно заключить, что гесперетин при одинаковых условиях обладает нейропротекторным действием как при глобальной, так и при фокальной ишемии.

Сохранение активности СОД под действием гесперетина при ишемии может быть объяснено его способностью защищать фермент от разрушающего действия активных радикалов, за счёт их нейтрализации [36]. Кроме того, в исследовании [213] была показана способность гесперетина индуцировать экспрессию генов цитоплазматической (SOD1) митохондриальной (SOD2) формы СОД у дрожжей через деацетилазу SIRT1. Отдельный интерес представляет разница в эффектах гесперетина на всё ишемизированное полушарие и приочаговую зону, а также отсутствие таковых различий у карнозина. Тем не менее, поскольку именно приочаговая зона является основной мишенью при нейропротекторной терапии инсульта, полученные на приочаговой зоне мозга данные являются приоритетными. Уменьшение активности СОД в плазме крови под действием гесперетина согласуется с нашими ранее полученными данными [3], демонстрирующие небольшое, но достоверное снижение экспрессии транскрипционного фактора Nrf2, регулирующего экспрессию СОД, в печени крыс под действием гликозида гесперетина - гесперидина. При этом, изученные концентрации гесперетина были примерно в 4 раза выше, чем в настоящей работе. Можно предположить, что в данном эксперименте тканевых концентраций гесперетина было достаточно в печени и других периферических тканях, но недостаточно в мозге, чтобы значимо повлиять через Nrf2 на экспрессию внеклеточной формы СОД, которая является основной в плазме крови [168].

Повышение резистентности к окислению, а также снижение уровня МДА в приочаговой зоне мозга крыс, получавших гесперетин, может быть объяснено его способностью напрямую нейтрализовать свободные радикалы, которая была подробно изучена, в частности, в работе [116], где была рассмотрена способность гесперетина *in vitro* нейтрализовывать свободные радикалы 2,2'-азобисизобутиронитрила и бензоилпероксида.

Для гесперетина существуют литературные данные, демонстрирующие его противовоспалительную активность. Глюкоронид гесперетина, гесперидин при его профилактическом внутрибрюшинном введении в дозе 30 мг/кг в течение 7 дней, также снижал экспрессию IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  в префронтальной коре мозга, индуцированную липополисахаридами [158]. Считается, что противовоспалительный эффект гесперетина связан с ингибированием транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [136]. Вместе с тем, в литературе отсутствуют исследования о влиянии кверцетина и гесперетина на процессы воспаления при ишемии мозга.

Кверцетин не продемонстрировал значимого эффекта на площадь ишемического очага при ишемии с реперфузией. Также для кверцетина не было обнаружено значимых эффектов в мозге при ишемии ни на один из измеряемых биохимических параметров.

При этом в плазме крови, кверцетин вызывал значимое снижение активности СОД, а также увеличивал антиоксидантную активность плазмы относительно контроля 2. Значимых эффектов на уровень ПОЛ для кверцетина в плазме крови обнаружено не было.

Для кверцетина в литературе показано его нейропротекторное действие при разных схемах введения на моделях глобальной ишемии [80, 208] и модели постоянной фокальной ишемии [154]. Кроме того, для кверцетина в исследовании [35] показано нейропротекторное действие на модели фокальной ишемии с реперфузией при его курсовом внутрибрюшинном введении в дозе 30 мг/кг за 1 ч до ишемии и через 0, 24, 48 и 72 ч после ишемии. Отсутствие значимого нейропротекторного эффекта кверцетина в настоящей работе, в отличие от

работы Ahmad et al. может быть объяснено разными схемами и способами введения. В данной работе животные получали кверцетин в течение недели до ишемии, тогда как в экспериментах Ahmad et al. животным начинали вводить кверцетин только за час до ишемии, и продолжали вводить уже после её начала. Для кверцетина показана способность накапливаться в ткани мозга при его систематическом пероральном введении [133], из чего можно предположить, что на момент начала ишемии с реперфузией в условиях данного эксперимента концентрация кверцетина в мозге могла быть выше, чем в работе Ahmad et al. При этом известно, что при достижении определённого порога концентрации, начинают накапливаться высокореактивные продукты окисления кверцетина - хиноны [199], что вызывает продукцию свободных радикалов. Это может быть особенно критично во время начала реперфузии при ишемии, когда продукция свободных радикалов, генерируемых электронтранспортной цепью митохондрий, наиболее интенсивна [202]. На основании этого можно сделать предположение, что в данном эксперименте накопление хинонов могло нивелировать его положительные эффекты как антиоксиданта при ишемии.

Различное влияние кверцетина на АОА мозга и плазмы крови при ишемии может объясняться разностью его концентраций в данных тканях. В исследовании Bieger et al. на свиньях, после 4 недель введения кверцетина в состав корма животных в дозе 50 мг/кг м.т. в сут., концентрация кверцетина и его конъюгатов в плазме была примерно в 30 раз выше, чем в мозге. Кроме того, в том же исследовании было показано, что в плазме крови кверцетин присутствует в основном в виде конъюгатов, тогда как в мозге он присутствует почти исключительно в виде агликона [54]. Вместе с тем, существуют исследования, в которых показано, что некоторые из конъюгатов кверцетина могут обладать большей антиоксидантной активностью, чем сам кверцетин. В работе Janisch et al. на тест-системе по ингибированию медь-индуцированного окисления липопротеидов низкой плотности человека, кверцетин-7-глюкоронид демонстрировал большую антиоксидантную активность, чем кверцетин [135]. Различие эффектов гесперетина и кверцетина на АОА в плазме крови крыс с

ишемией, при одинаковых схемах введения, может заключаться в их разной способности непосредственно нейтрализовывать свободные радикалы. В исследовании Aizawa et al. при сравнении антиоксидантной активности кверцетина и гесперетина, измеряемой по их способности нейтрализовывать свободный радикал 1,1-дифенил-2-пиклилгидразил, авторы показали, что способность к нейтрализации радикалов у кверцетина примерно в 3 раза выше, чем у гесперетина.

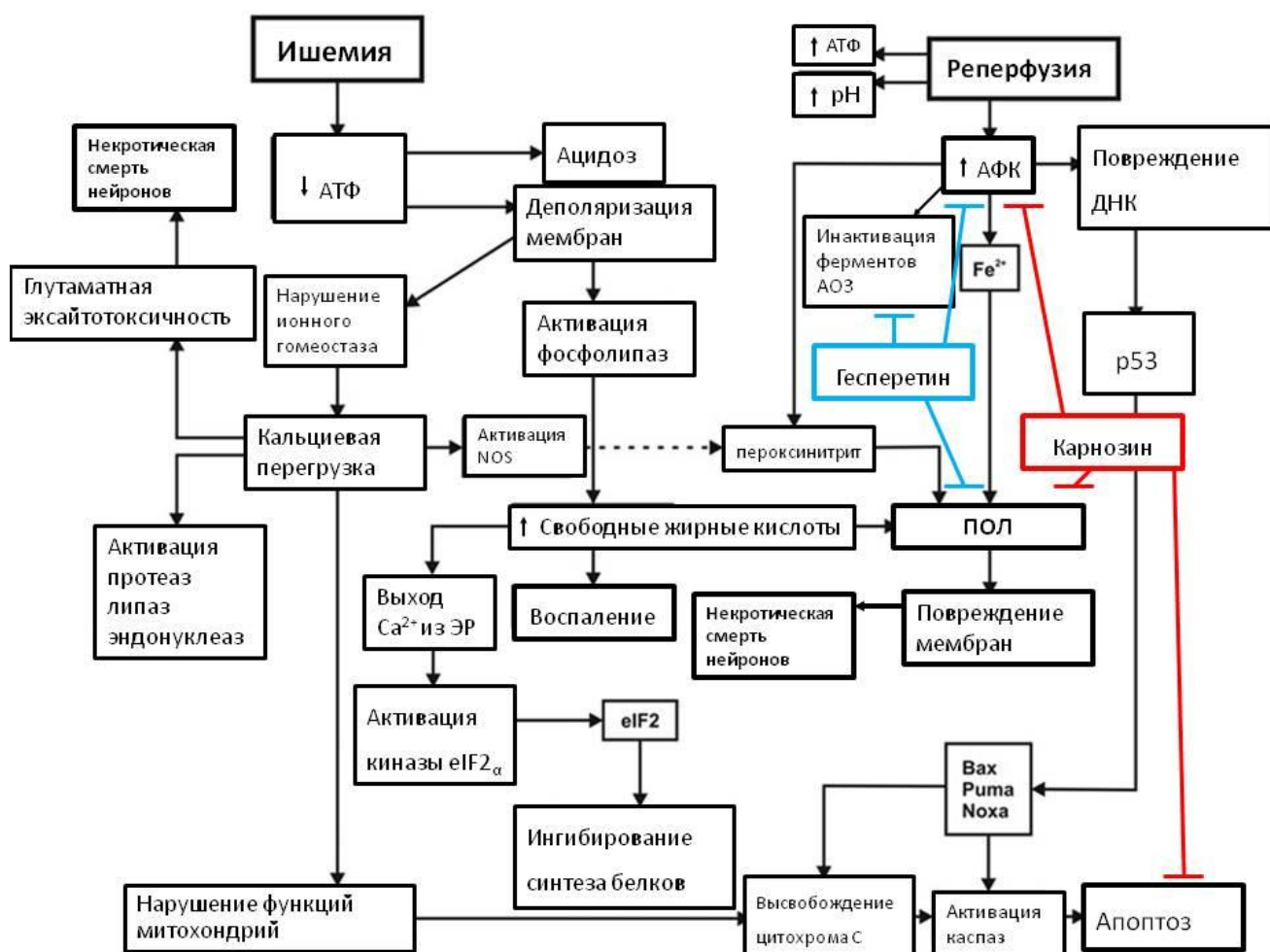
Для кверцетина существует ряд исследований на моделях *in vitro* и *in vivo*, демонстрирующих их противовоспалительную активность. Кверцетин, в исследовании [59] на нейроглиальной культуре клеток, в концентрации 0,1 мкМ снижал уровень цитокинов IL-6, IL-1b и TNF $\alpha$  в присутствии индуктора воспаления 1-метил-4-фенилпиридина. В другом исследовании [174] на модели хронического стресса у мышей, кверцетин при его пероральном введении в дозе 30 мг/кг в течение 21 дня, снижал в гиппокампе экспрессию цитокинов IL-1b, IL-6 и TNF $\alpha$ . Считается, что противовоспалительный эффект кверцетина, также как и гесперетина, связан с ингибированием транскрипционного фактора NF-kB [140]. Вместе с тем, в литературе отсутствуют исследования о влиянии кверцетина на процессы воспаления при ишемии мозга.

Таким образом в данной работе было выявлено, что кора большого мозга гетерогенна по показателям окислительного статуса: как антиоксидантная активность, так и уровень гидроперекисей у интактных животных были повышены в лобных долях мозга по сравнению с другими зонами коры мозга.

Показано, что карнозин и гесперетин при их предварительном введении в рацион оказывают выраженное нейропротекторное действие при фокальной ишемии головного мозга с реперфузией у крыс. Для карнозина также показано нейропротекторное действие при его терапевтическом введении в постишемический период при длительной 72 ч необратимой ишемии.

На основании литературных данных [75] и результатов собственных исследований построена схема основных путей патохимического каскада при ишемии (Рисунок 5.1). На данной схеме показаны механизмы действия карнозина

и гесперетина на ишемический каскад. Установлено, что и карнозин и гесперетин препятствуют развитию ишемического повреждения в мозге за счёт нейтрализации активных форм кислорода и снижения интенсивности ПОЛ. Гесперетин может также препятствовать снижению активности ферментов АОЗ, в частности СОД, под действием ишемии. Помимо антиоксидантной активности для карнозина показана способность препятствовать активации проапоптотических сигнальных путей при ишемии.



**Рисунок 5.1** – Действие карнозина и гесперетина на патохимический каскад при фокальной ишемии

## 6. ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что лобные доли коры головного мозга у интактных крыс и у крыс с постоянной ишемией характеризуются более высоким уровнем липидных гидроперекисей (на 25%,  $p \leq 0,05$ ) и общей антиоксидантной активности (на 17%,  $p \leq 0,05$ ) относительно других отделов коры.
2. Выявлено, что через сутки после начала ишемии выраженное изменение показателей окислительного стресса (от 22 до 63%,  $p \leq 0,05$ ) наблюдается только в ишемизированном полушарии мозга, тогда как изменение уровня белков и активности ферментов апоптоза (от 60 до 280%,  $p \leq 0,05$ ) наблюдается в обоих полушариях. При этом в ишемизированном полушарии при ишемии с реперфузией, установлены существенные различия в изменении показателей окислительного статуса относительно контроля в целом полушарии и в изолированной приочаговой зоне коры мозга.
3. Впервые обнаружено, что карнозин обладает нейропротекторным действием в низких дозах, снижая площадь ишемического очага относительно контроля как при введении с рационом перед ишемией (на 21 %,  $p \leq 0,05$ ), так и при внутрибрюшинном введении в постишемический период (на 27% и 39%,  $p \leq 0,05$  соответственно в дозах 50 и 500 мг/кг м.т), путём снижения относительно животных с ишемией образования МДА (на 21% для введения перед ишемией), липидных гидроперекисей (33% и 40%,  $p \leq 0,05$  соответственно в дозах 50 и 500 мг/кг м.т для введения после ишемии) и дозозависимого повышения общей антиоксидантной активности (на 58% и 85%,  $p \leq 0,05$  соответственно в дозах 50 и 500 мг/кг м.т. для введения после ишемии; на 85% для введения перед ишемией).
4. Обнаружено, что карнозин при необратимой фокальной ишемии препятствует развитию апоптоза за счёт увеличения относительно ишемии активации Akt (на 272% и 197%,  $p \leq 0,05$  соответственно в дозах 50 и 500 мг/кг м.т.), и нормализации соотношения Bcl-2/Bax в приочаговой зоне (1,47 и 1,10 соответственно в дозах 50 и 500 мг/кг м.т.) от уровня при ишемии (0,67) до уровня, наблюдаемого у контрольных животных (1,00).
5. Впервые показано, что гесперетин при профилактическом введении с рационом проявляет выраженное нейропротекторное действие при ишемии с реперфузией, снижая площадь ишемического очага на 30%,  $p \leq 0,05$ , снижая образование продуктов перекисного окисления липидов (МДА) на 31%,  $p \leq 0,05$ , повышая антиоксидантную активность ткани мозга на 115%,  $p \leq 0,05$ , а также повышая активность супероксиддисмутазы в мозге на 33%,  $p \leq 0,05$ .
6. На модели 24 ч ишемии с реперфузией при профилактическом введении с рационом кверцетин не проявляет нейропротекторного действия, а также не влияет на показатели окислительного статуса и воспалительных процессов в ткани мозга.
7. Как карнозин, так и гесперетин при ишемии с реперфузией снижают уровень продуктов ПОЛ и восстанавливают антиоксидантную активность ткани мозга. Вместе с тем, гесперетин в большей степени оказывает влияние на активность супероксиддисмутазы в мозге, по сравнению с карнозином.
8. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о целесообразности проведения клинических испытаний по оценке эффективности применения гесперетина и карнозина как компонентов комбинированной терапии для лечения пациентов с ишемическим инсультом.

## 7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОА - общая антиоксидантная активность  
АОЗ - антиоксидантная защита  
АТФ - аденозинтрифосфат  
АФК - активные формы кислорода  
ГП - глутатионпероксидаза  
ГТ - глутатионтрансфераза  
ГЭБ - гематоэнцефалический барьер  
ДНФГ - динитрофенилгидразин  
КАТ - каталаза  
КПБ - карбонильные производные белков  
МДА - малоновый диальдегид  
НСТ - нитросиний тетразолий  
ОС - окислительный стресс  
ПОЛ - перекисное окисление липидов  
СМА - среднемозговая артерия  
СОД - супероксиддисмутаза  
ТТХ - 2,3,5 трифенилтетразолий хлорид  
ФМС - феназинметсульфат  
ХЛ - хемилюминесценция  
ЦНС - центральная нервная система  
ЭДТА - этилендиаминтетраацетат  
ЭТЦ - электронтранспортная цепь  
ARE - AU-rich element  
Bad - Bcl-2-associated death promoter  
Bak - Bcl-2 homologous antagonist/killer  
BAP31 - B-cell receptor-associated protein 31  
Bax - Bcl-2-associated X protein  
Bcl-2 - B-cell lymphoma 2 protein  
Bcl-W - Bcl-2-like protein 2  
Bcl-XL - Bcl-2, B-cell lymphoma-extra-large  
BDNF - Brain-derived neurotrophic factor  
Bid - BH3 interacting-domain death agonist  
Bim - Bcl-2 protein produced by bim gene  
CREB - cAMP response element-binding protein  
FRAP - ferric reducing antioxidant power  
GSH - Glutathione reduced

GS-SG - Glutathione oxidized  
HIF-1 - hypoxia-inducible factor 1  
HMGB1 - High mobility group box 1 protein  
Hsp70 - 70 kilodalton heat shock protein  
ICAM-1 - Intercellular Adhesion Molecule 1  
IL-10 - Interleukin 10  
IL-17 - Interleukin 17  
IL-1 $\beta$  - Interleukin 1 $\beta$   
IL-4 - Interleukin 4  
MAPK - mitogen-activated protein kinase  
NADH- Nicotinamide adenine dinucleotide reduced  
NADPH - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced  
NF- $\kappa$ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NMDA - N-Methyl-D-aspartate  
Nrf2 - Nuclear factor 2  
PPAR - Peroxisome proliferator-activated receptor  
TLR - Toll-like receptor  
TNF- $\alpha$  - Tumor necrosis factor  $\alpha$   
tPA - tissue plasminogen activator  
TPTZ - tripyridyltriazine



## 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаимов Д.А. [и др.]. Исследование базовых фармакокинетических характеристик и эффективности проникновения в ткань мозга дипептида карнозина в эксперименте // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, № 3. – С. 30–35.
2. Абе Х. Роль гистидин-содержащих соединений как внутриклеточных протонных буферных компонентов мышц позвоночных // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 891–900.
3. Балакина А.С. [и др.]. Влияние рутина и гесперидина на экспрессию гена Nrf2 и активность гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы при их отдельном и совместном действии // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85, № 3. – С. 18–26.
4. Белоусова М.А. Нейропротекторная эффективность коэнзима Q10 на модели фокальной ишемии головного мозга в эксперименте: дис. ...канд. мед. наук: 14.03.06 / Белоусова Маргарита Алексеевна. – М., 2015. – 162 с.
5. Болдырев А.А. Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине. М.: Изд-во МГУ, – 1998. 320 с
6. Болдырев А.А. Карнозин: новые концепции для функций давно известной молекулы // Биохимия. – 2012. – Т. 77, № 4. – С. 403–418.
7. Владимиров Ю.А. [и др.]. Дигидрокверцетин (таксифолин) и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптоза // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 3. – С. 372–379.
8. Гусев Е.И. [и др.]. Неврология: Национальное руководство. – 2009. 1040 с.
9. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, – 2001. 328 с.
10. Гусев Е.И. [и др.]. Определение содержания нейротрансмиттерных аминокислот в ликворе у больных с острым ишемическим инсультом // Функциональные исследования как основа создания лекарственных средств. – 1995. – С. 133–134.
11. Девятов А.А. [и др.]. Оценка показателей окислительного статуса мозга и плазмы крови у крыс при фокальной ишемии-реперфузии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 2. – С. 156–159.
12. Девятов А.А. [и др.]. Исследование нейропротекторных механизмов действия карнозина при экспериментальной фокальной ишемии/реперфузии // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64, № 4. – С. 344–348.
13. Девятов А.А., Рыжков И.Н. Действие минорных компонентов пищи

карнозина, кверцетина и гесперетина при экспериментальной фокальной ишемии/реперфузии // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87, № S5. – С. 256–257.

14. Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Мазо В.К. Витамины и окислительный стресс // Вопросы питания. – 2013. – Т. 82, № 3. – С. 11–8.

15. Кондакова Н.В., Заичкина С.И., Аптикаева Г.Ф. Антимутагенное действие дигидрокверцетина при окислительном стрессе, вызванном гамма-облучением у мышей // Материалы III международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». – 1999. – С. 30–34.

16. Курелла Е.Г., Мальцева В.В. Стимулирующее действие карнозина на гемопоэтические клетки // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1991. № 7. – С. 52–53.

17. Лопачев А.В. [и др.]. Нейропротекторное действие карнозина на первичную культуру клеток мозжечка крысы в условиях окислительного стресса // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 5. – С. 678–689.

18. Лопачева О.М. [и др.]. Карнозин восстанавливает активацию сигнальных каскадов и соотношение белков-регуляторов апоптоза в приочаговой зоне при необратимой фокальной ишемии мозга у крыс // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2018. – Т. 12, № 1. – С. 38–49.

19. Макарова М.Н., Макаров В.Г. Молекулярная биология флавоноидов (химия, биохимия, фармакология): Руководство для врачей. Санкт-Петербург: Издательство «Лема». – 2010. 428 с.

20. Пирадов М.А. [и др.]. Нейропротекция при цереброваскулярных заболеваниях: поиск жизни на Марсе или перспективное направление лечения? Часть 1. Острые нарушения мозгового кровообращения // Анналы неврологии. – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 41–49.

21. Скворцова В.И. [и др.]. Результаты реализации «комплекса мероприятий по совершенствованию медицинской помощи пациентам с острыми нарушениями мозгового кровообращения в Российской Федерации» // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т. 118, № 4. – С. 5–12.

22. Стволинский С.Л. [и др.]. Влияние карнозина на крыс в условиях экспериментальной ишемии мозга // Доклады академии наук. – 2000. – Т. 65, № 7. – С. 998–1005.

23. Стволинский С.Л. [и др.]. Защита Cu,Zn-СОД карнозином при нарушениях окислительного метаболизма в мозге *in vivo* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2003. – Т. 135, № 2. – С. 151–154.

24. Стволинский С.Л. [и др.]. Нейропротективное действие карнозина в

условиях экспериментальной фокальной ишемии-реперфузии головного мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – Т. 117, № 12–2. – С. 60–64.

25. Изучение модулирующего действия некоторых биологически активных веществ пищи на развитие метаболического синдрома у крыс: отчёт о НИР / Тутельян В.А. – Москва: ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 2018. – 162 с.

26. Тутельян В.А., Лашнева Н.В. Биологически активные вещества растительного происхождения. Флаваноны: пищевые источники, биодоступность, влияние на ферменты метаболизма ксенобиотиков // Вопросы питания. – 2011. – Т. 80, № 5. – С. 5–21.

27. Тутельян В.А., Лашнева Н.В. Биологически активные вещества растительного происхождения. Флавонолы и флавоны: распространенность, пищевые источники, потребление // Вопросы питания. – 2013. – Т. 82, № 1. – С. 4–22.

28. Федорова Т.Н. [и др.]. Нейропротекторное действие карнозина в условиях фокальной ишемии мозга // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2017. – Т. 20, № 4. – С. 25–31.

29. Федорова Т.Н. [и др.]. Оценка окислительного статуса различных зон коры головного мозга крыс Вистар при фокальной ишемии и его модуляции карнозином // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 165, № 6. – С. 703–708.

30. Федорова Т.Н., Болдырев А.А., Ганнушкина И.. Перекисное окисление липидов при экспериментальной ишемии мозга // Биохимия. – 1999. – Т. 64, № 1. – С. 94–98.

31. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / под ред. З.А. Суслина, М.А. Пирадов. Москва: МЕДпресс-информ, – 2009. II издание. 288 с.

32. Adams J.M., Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26, N 1. – P. 61–6.

33. Ademosun A.O. [et al.]. Antioxidative Properties and Effect of Quercetin and Its Glycosylated Form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities // J. Evidence-Based Complement. Altern. Med. – 2016. – Vol. 21, N 4. – P. NP11–NP17.

34. Aebi H. Catalase in vitro // Methods Enzymol. – 1984. – Vol. 105. – P. 121–126.

35. Ahmad A. [et al.]. Quercetin protects against oxidative stress associated damages in a rat model of transient focal cerebral ischemia and reperfusion // Neurochem. Res. – 2011. – Vol. 36, N 8. – P. 1360–1371.

36. Aizawa Y. [et al.]. Design and evaluation of a novel flavonoid-based

- radioprotective agent utilizing monoglucosyl rutin // *J. Radiat. Res.* – 2018. – Vol. 59, N 3. – P. 272–281.
37. Alexandrova M.L., Bochev P.G. Oxidative Stress in Stroke // *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders* / A. Qureshi, S.H. Parvez eds. Amsterdam: Elsevier Science, – 2007. First Edit. – P. 313–368.
38. Allen C.L., Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke // *Int. J. Stroke.* – 2009. – Vol. 4, N 6. – P. 461–70.
39. Ames A. [et al.]. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon // *Am. J. Pathol.* – 1968. – Vol. 52, N 2. – P. 437–53.
40. Anand David A., Arulmoli R., Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid // *Pharmacogn. Rev.* – 2016. – Vol. 10, N 20. – P. 84.
41. Ankarcrona M. [et al.]. Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 394, N 3. – P. 321–324.
42. Antonsson B. [et al.]. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 15. – P. 11615–11623.
43. Asperger A. [et al.]. Identification of factors involved in the anti-tumor activity of carnosine on glioblastomas using a proteomics approach // *Cancer Invest.* – 2011. – Vol. 29, N 4. – P. 272–281.
44. Astrup J. [et al.]. Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia // *Stroke.* – 1977. – Vol. 8, N 1. – P. 51–57.
45. Astrup J., Siesjö B.K., Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra // *Stroke.* – 1981. – Vol. 12, N 6. – P. 723–725.
46. Bae O.-N. [et al.]. Safety and Efficacy Evaluation of Carnosine, an Endogenous Neuroprotective Agent for Ischemic Stroke // *Stroke.* – 2013. – Vol. 44, N 1. – P. 205–212.
47. Balaban R.S. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2002. – Vol. 34, N 10. – P. 1259–1271.
48. Bargatze R.F. [et al.]. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 180, N 5. – P. 1785–92.
49. Beghoul A. [et al.]. Impairment of mitochondrial integrity and redox status in brain regions during a low-dose long-term exposition of rats to pyrethroids: the preventive effect of quercetin // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2017. – Vol. 24, N 24. – P. 19714–19722.

50. Belayev L. [et al.]. Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window // *Stroke*. – 2001. – Vol. 32, N 2. – P. 553–560.
51. Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay // *Anal. Biochem.* – 1996. – Vol. 239, N 1. – P. 70–76.
52. Berezhnoy D.S. [et al.]. Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions // *Amino Acids*. – 2019. – Vol. 51, N 1. – P. 139–150.
53. Bernardes-Silva M. [et al.]. Recruitment of neutrophils across the blood-brain barrier: the role of E- and P-selectins // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2001. – Vol. 21, N 9. – P. 1115–1124.
54. Bieger J. [et al.]. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation // *J. Nutr.* – 2008. – Vol. 138, N 8. – P. 1417–1420.
55. Boldyrev A., Dobrotvorskaya, I. Stepanova M., Berezov T. Carnosine Induces Expression of Transcriptional Factors in Cultured Neurons Which Increase Neuronal Viability Under Oxidative Stress // 18 Annual Meeting of the Soc. Free Rad. Biol. Med. Atlanta, USA. – 2011. – P. 245.
56. Boldyrev A.A. [et al.]. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1988. – Vol. 89, N 2. – P. 245–50.
57. Boldyrev A.A. *Carnosine and Oxidative Stress in Cells and Tissues*. New York, NY: Nova Biomed, – 2007. – 297 p.
58. Boldyrev A.A. [et al.]. Carnosine Induces Expression of Transcriptional Factors in Cultured Neurons Which Increase Neuronal Viability Under Oxidative Stress // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51. – P. S12.
59. Bournival J. [et al.]. Quercetin and Sesamin Protect Dopaminergic Cells from MPP + -Induced Neuroinflammation in a Microglial (N9)-Neuronal (PC12) Coculture System // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–11.
60. Brahmhatt V. [et al.]. Protective effects of dietary EPA and DHA on ischemia-reperfusion-induced intestinal stress // *J. Nutr. Biochem.* – 2013. – Vol. 24, N 1. – P. 104–111.
61. Brait V.H. [et al.]. Importance of T Lymphocytes in Brain Injury, Immunodeficiency, and Recovery after Cerebral Ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2012. – Vol. 32, N 4. – P. 598–611.
62. Branston N.M., Hope D.T., Symon L. Barbiturates in focal ischemia of primate cortex: Effects on blood flow distribution, evoked potential and extracellular potassium

// Stroke. – 1979. – Vol. 10, N 6. – P. 647–653.

63. Bredsdorff L. [et al.]. Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from rhamnosidase-treated orange juice in human subjects // Br. J. Nutr. – 2010. – Vol. 103, N 11. – P. 1602–1609.

64. Bright R. [et al.]. Protein kinase C delta mediates cerebral reperfusion injury in vivo // J. Neurosci. – 2004. – Vol. 24, N 31. – P. 6880–6888.

65. Brodie C. [et al.]. Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion // J. Neuroimmunol. – 1998. – Vol. 81, N 1–2. – P. 20–30.

66. Brookes P.S. [et al.]. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2004. – Vol. 287, N 4. – P. C817–C833.

67. Bruce A.J. [et al.]. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors // Nat. Med. – 1996. – Vol. 2, N 7. – P. 788–794.

68. Chen H. [et al.]. Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection // Antioxid. Redox Signal. – 2011. – Vol. 14, N 8. – P. 1505–1517.

69. Chen J. [et al.]. Bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat // Neuroreport. – 1995. – Vol. 6, N 2. – P. 394–398.

70. Chen S.T. [et al.]. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction // Stroke. – 1986. – Vol. 17, N 4. – P. 738–743.

71. Cheng C.-Y. [et al.]. Ferulic Acid Administered at Various Time Points Protects against Cerebral Infarction by Activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/Bcl-2 Anti-Apoptotic Signaling in the Subacute Phase of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 5. – P. e0155748.

72. Cherubini A. [et al.]. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke // Curr. Med. Chem. – 2008. – Vol. 15, N 12. – P. 1236–1248.

73. Choi E.J., Ahn W.S. Neuroprotective effects of chronic hesperetin administration in mice // Arch. Pharm. Res. – 2008. – Vol. 31, N 11. – P. 1457–1462.

74. Choi S.Y. [et al.]. Hydrogen peroxide-mediated Cu,Zn-superoxide dismutase fragmentation: protection by carnosine, homocarnosine and anserine // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1472, N 3. – P. 651–657.

75. Chomova M., Zitnanova I. Look into brain energy crisis and membrane pathophysiology in ischemia and reperfusion // Stress. – 2016. – Vol. 19, N 4. – P. 341–348.

76. Chou W.-H. [et al.]. Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-

reperfusion injury // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 114. – P. 49–56.

77. Clausen B.H. [et al.]. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice // *J. Neuroinflammation.* – 2008. – Vol. 5. – P. 46.

78. Coyle J.T., Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders // *Science.* – 1993. – Vol. 262, N 5134. – P. 689–695.

79. Crack P.J. [et al.]. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury // *J. Neurochem.* – 2001. – Vol. 78, N 6. – P. 1389–1399.

80. Das S. [et al.]. Nanoparticulated Quercetin in Combating Age Related Cerebral Oxidative Injury // *Curr. Aging Sci.* – 2008. – Vol. 1, N 3. – P. 169–174.

81. Davalos D. [et al.]. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo // *Nat. Neurosci.* – 2005. – Vol. 8, N 6. – P. 752–758.

82. Davis C.K. [et al.]. Systematic review and stratified meta-analysis of the efficacy of carnosine in animal models of ischemic stroke // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2016. – Vol. 36, N 10. – P. 1686–1694.

83. Davis S.M. [et al.]. Selfotel in acute ischemic stroke : possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist // *Stroke.* – 2000. – Vol. 31, N 2. – P. 347–354.

84. Diel G.A. Brain Lactate Metabolism: The Discoveries and the Controversies // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2012. – Vol. 32, N 7. – P. 1107–1138.

85. Dimpfel W. Different anticonvulsive effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on electrical activity in the rat hippocampus in-vitro // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 58, N 3. – P. 375–379.

86. Dobrota D. [et al.]. Carnosine protective effect on ischemic brain using proton magnetic resonance spectroscopy // *Neurochemistry: Cellular, Molecular and clinical aspects.* NY and London: Plenum Press, – 1997. – P. 43–49.

87. Doll D.N., Barr T.L., Simpkins J.W. Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets // *Aging Dis.* – 2014. – Vol. 5, N 5. – P. 294–306.

88. Doyle K.P., Simon R.P., Stenzel-Poore M.P. Mechanisms of ischemic brain damage // *Neuropharmacology.* – 2008. – Vol. 55, N 3. – P. 310–318.

89. Edwards E.A., Dean L.M. Effects of crowding of mice on humoral antibody formation and protection to lethal antigenic challenge // *Psychosom. Med.* . – 1977. – Vol. 39, N 1. – P. 19–24.

90. Elavarasan J. [et al.]. Hesperidin-mediated expression of Nrf2 and upregulation of antioxidant status in senescent rat heart // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 64, N 10.

– P. 1472–1482.

91. Faraci F.M. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – Vol. 100, N 2. – P. 739–743.
92. Fedorova T.N., Boldyrev A.A., Gannushkina I. V. Lipid peroxidation in experimental ischemia of the brain // *Biochem. Biokhimiia*. – 1999. – Vol. 64, N 1. – P. 75–79.
93. Ferreira de Oliveira J.M.P., Santos C., Fernandes E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models // *Phytomedicine*. – 2019. – P. 152887.
94. Ferrer I., Planas A.M. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2003. – Vol. 62, N 4. – P. 329–339.
95. Feuerstein G.Z. [et al.]. Missing steps in the STAIR case: a Translational Medicine perspective on the development of NXY-059 for treatment of acute ischemic stroke // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2008. – Vol. 28, N 1. – P. 217–219.
96. Fiskum G. Involvement of mitochondria in ischemic cell injury and in regulation of intracellular calcium // *Am. J. Emerg. Med.* – 1983. – Vol. 1, N 2. – P. 147–153.
97. Flohé L., Günzler W.A. Assays of glutathione peroxidase // *Methods Enzymol.* – 1984. – Vol. 105. – P. 114–121.
98. Fluri F., Schuhmann M.K., Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2015. – Vol. 9. – P. 3445–3454.
99. Garcia J.H. [et al.]. Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats // *Stroke*. – 1997. – Vol. 28, N 11. – P. 2303–2309; discussion 2310.
100. Garg A. [et al.]. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin // *Phyther. Res.* – 2001. – Vol. 15, N 8. – P. 655–669.
101. Gaur V., Kumar A. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction // *Pharmacol. Reports*. – 2010. – Vol. 62, N 4. – P. 635–648.
102. Gelderblom M. [et al.]. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke // *Blood*. – 2012. – Vol. 120, N 18. – P. 3793–3802.
103. Gil-Agustí M., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. Anserine and carnosine determination in meat samples by pure micellar liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. – 2008. – Vol. 1189, N 1–2. – P. 444–450.



104. Ginsberg M.D. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview // *Stroke*. – 2009. – Vol. 40, N 3 Suppl. – P. S111-S114.
105. Graham S.H., Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2001. – Vol. 21, N 2. – P. 99–109.
106. Graham S.H., Chen J., Clark R.S.B. Bcl-2 Family Gene Products in Cerebral Ischemia and Traumatic Brain Injury // *J. Neurotrauma*. – 2000. – Vol. 17, N 10. – P. 831–841.
107. Grupke S. [et al.]. Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: from review to preview // *Clin. Neurol. Neurosurg.* – 2015. – Vol. 129. – P. 1–9.
108. Gu W. [et al.]. Catalase over-expression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia // *Neuroreport*. – 2004. – Vol. 15, N 3. – P. 413–416.
109. Guiotto A. [et al.]. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review // *Curr. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 12, N 20. – P. 2293–2315.
110. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249, N 22. – P. 7130–7139.
111. Harborne J.B., Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992 // *Phytochemistry*. – 2000. – Vol. 55, N 6. – P. 481–504.
112. Heiss W.D. [et al.]. Effect of nimodipine on regional cerebral glucose metabolism in patients with acute ischemic stroke as measured by positron emission tomography // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1990. – Vol. 10, N 1. – P. 127–132.
113. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis // *Nature*. – 2000. – Vol. 407, N 6805. – P. 770–776.
114. Hill J.K. [et al.]. Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice // *Brain Res.* – 1999. – Vol. 820, N 1–2. – P. 45–54.
115. Hipkiss A.R. On the enigma of carnosine's anti-ageing actions // *Exp. Gerontol.* – 2009. – Vol. 44, N 4. – P. 237–242.
116. Hirata A. [et al.]. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression // *Anticancer Res.* – 2005. – Vol. 25, N 5. – P. 3367–3374.
117. Hollman P., Katan M. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man // *Biomed. Pharmacother.* – 1997. – Vol. 51, N 8. – P. 305–310.
118. Hopper R.K. [et al.]. Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45, N 8. – P. 2524–2536.
119. Horn J. [et al.]. Very Early Nimodipine Use in Stroke (VENUS): A randomized,

- double-blind, placebo-controlled trial // *Stroke*. – 2001. – Vol. 32, N 2. – P. 461–465.
120. Horn J., Limburg M. Calcium Antagonists for Ischemic Stroke: A Systematic Review // *Stroke*. – 2001. – Vol. 32. – P. 570–576.
121. Hossmann K.A. Ischemia-mediated neuronal injury // *Resuscitation*. – 1993. – Vol. 26, N 3. – P. 225–35.
122. Hossmann K.A. Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised // *Brain Pathol.* – 1994. – Vol. 4, N 1. – P. 23–36.
123. Hossmann K.A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia // *Ann. Neurol.* – 1994. – Vol. 36, N 4. – P. 557–565.
124. Hsien C. [et al.]. Inhibitory Effect of Carnosine and Anserine on DNA Oxidative Damage Induced by Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in lymphocytes // *J. Food Drug Anal.* – 2002. – Vol. 10. – P. 47–54.
125. Hu W.-W., Chen Z. Role of Histamine and Its Receptors in Cerebral Ischemia // *ACS Chem. Neurosci.* – 2012. – Vol. 3, N 4. – P. 238–247.
126. Huang J. [et al.]. Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein // *Science*. – 1999. – Vol. 285. – P. 595–599.
127. Huang J., Upadhyay U.M., Tamargo R.J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia // *Surg. Neurol.* – 2006. – Vol. 66, N 3. – P. 232–245.
128. Huang S.M. [et al.]. Cytoprotective effects of hesperetin and hesperidin against amyloid-induced impairment of glucose transport through downregulation of neuronal autophagy // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2012. – Vol. 56, N 4. – P. 601–609.
129. Hurn P.D. [et al.]. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2007. – Vol. 27, N 11. – P. 1798–1805.
130. Hüttemann M. [et al.]. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2008. – Vol. 40, N 5. – P. 445–456.
131. Hwang S.-L., Yen G.-C. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in PC12 cells // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – Vol. 56, N 3. – P. 859–864.
132. Investigators Enlimomab Acute Stroke Trial. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial // *Neurology*. – 2001. – Vol. 57. – P. 1428–1434.
133. Ishisaka A. [et al.]. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51, N 7. – P. 1329–1336.

134. Ito U. [et al.]. Brain edema during ischemia and after restoration of blood flow. Measurement of water, sodium, potassium content and plasma protein permeability // *Stroke*. – 1979. – Vol. 10, N 5. – P. 542–547.
135. Janisch K.M. [et al.]. Properties of Quercetin Conjugates: Modulation of LDL Oxidation and Binding to Human Serum Albumin // *Free Radic. Res.* – 2004. – Vol. 38, N 8. – P. 877–884.
136. Javed H. [et al.]. Effect of hesperidin on neurobehavioral, neuroinflammation, oxidative stress and lipid alteration in intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment in mice // *J. Neurol. Sci.* – 2015. – Vol. 348, N 1–2. – P. 51–59.
137. Jiang N., Chopp M., Chahwala S. Neutrophil inhibitory factor treatment of focal cerebral ischemia in the rat // *Brain Res.* – 1998. – Vol. 788, N 1–2. – P. 25–34.
138. Kalogeris T. [et al.]. Ischemia/Reperfusion // *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., – 2016. – P. 113–170.
139. Kamat C.D. [et al.]. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges // *J. Alzheimers. Dis.* – 2008. – Vol. 15, N 3. – P. 473–493.
140. Kang C.-H. [et al.]. Quercetin inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglial cells by suppressing the NF- $\kappa$ B pathway and activating the Nrf2-dependent HO-1 pathway // *Int. Immunopharmacol.* – 2013. – Vol. 17, N 3. – P. 808–813.
141. Katsura K. [et al.]. Extracellular pH in the Brain during Ischemia: Relationship to the Severity of Lactic Acidosis // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1991. – Vol. 11, N 4. – P. 597–599.
142. Kawanokuchi J. [et al.]. Production and functions of IL-17 in microglia // *J. Neuroimmunol.* – 2008. – Vol. 194, N 1–2. – P. 54–61.
143. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia // *Brain Res.* – 1982. – Vol. 239, N 1. – P. 57–69.
144. Klebanov G.I. [et al.]. Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine // *Biochem Mol Biol Int.* – 1997. – Vol. 43, N 1. – P. 99–106.
145. Konsman J.P. [et al.]. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – Vol. 472, N 1. – P. 113–29.
146. Krams M. [et al.]. Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN) // *Stroke*. – 2003. – Vol. 34, N 11. – P. 2543–2548.
147. Krieger D.W. [et al.]. Cooling for acute ischemic brain damage (cool aid): an open pilot study of induced hypothermia in acute ischemic stroke // *Stroke*. – 2001. –

Vol. 32, N 8. – P. 1847–54.

148. Krishnamurthi R. V [et al.]. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 // *Lancet Glob. Heal.* – 2013. – Vol. 1, N 5. – P. e259–e281.

149. Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6. – P. 513–519.

150. Kumar A. [et al.]. Protective effect of quercetin against ICV colchicine-induced cognitive dysfunctions and oxidative damage in rats // *Phytother. Res.* – 2008. – Vol. 22, N 12. – P. 1563–1569.

151. Kumar V. [et al.]. Robbins and Cotran pathologic basis of disease / J.C.A. Vinay Kumar, Abul K. Abbas eds. 9th Edition: Elsevier/Saunders, 2015. 1391 p.

152. Kunz A., Iadecola C. Cerebral vascular dysregulation in the ischemic brain // *Handb. Clin. Neurol.* – 2009. – Vol. 92. – P. 283–305.

153. Le D.A. [et al.]. Caspase activation and neuroprotection in caspase-3- deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – Vol. 99. – P. 15188–15193.

154. Lee J.K. [et al.]. Quercetin reduces the elevated matrix metalloproteinases-9 level and improves functional outcome after cerebral focal ischemia in rats // *Acta Neurochir. (Wien)*. – 2011. – Vol. 153, N 6. – P. 1321–1329.

155. Lees K.R. [et al.]. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): Randomised controlled trial // *Lancet.* – 2004. – Vol. 363. – P. 439–445.

156. Lenney J.F. Separation and characterization of two carnosine-splitting cytosolic dipeptidases from hog kidney (carnosinase and non-specific dipeptidase) // *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* – 1990. – Vol. 371, N 5. – P. 433–440.

157. Li H.L. [et al.]. IL-17 and IFN-gamma mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat // *J. Neuroimmunol.* – 2001. – Vol. 116, N 1. – P. 5–14.

158. Li M. [et al.]. Hesperidin Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation in Mice by Promoting the miRNA-132 Pathway // *Inflammation.* – 2016. – Vol. 39, N 5. – P. 1681–1689.

159. Liesz A. [et al.]. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15, N 2. – P. 192–199.

160. Lipton S.A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – Vol. 8, N 10. – P. 803–808.

161. Longa E.Z. [et al.]. Reversible middle cerebral artery occlusion without

craniectomy in rats // *Stroke*. – 1989. – Vol. 20, N 1. – P. 84–91.

162. Lu Q. [et al.]. rLj-RGD3, a Novel Recombinant Toxin Protein from *Lampetra japonica*, Protects against Cerebral Reperfusion Injury Following Middle Cerebral Artery Occlusion Involving the Integrin-PI3K/Akt Pathway in Rats // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, N 10. – P. e0165093.

163. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2013. – Vol. 53, N 1. – P. 401–426.

164. MacMillan-Crow L.A., Thompson J.A. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1999. – Vol. 366, N 1. – P. 82–88.

165. Majid A. Neuroprotection in stroke: past, present, and future // *ISRN Neurol.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 515716.

166. Mansoorali K.P. [et al.]. Cerebroprotective effect of *Eclipta alba* against global model of cerebral ischemia induced oxidative stress in rats // *Phytomedicine*. – 2012. – Vol. 19, N 12. – P. 1108–1116.

167. Mark L.P. [et al.]. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging // *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* – 2001. – Vol. 22, N 10. – P. 1813–1824.

168. Marklund S. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines // *J. Clin. Invest.* – 1984. – Vol. 74, N 4. – P. 1398–1403.

169. Marsh B. [et al.]. Systemic Lipopolysaccharide Protects the Brain from Ischemic Injury by Reprogramming the Response of the Brain to Stroke: A Critical Role for IRF3 // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29, N 31. – P. 9839–9849.

170. Marsh B.J., Stenzel-Poore M.P. Toll-like receptors: novel pharmacological targets for the treatment of neurological diseases // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 8, N 1. – P. 8–13.

171. Matsuda S. [et al.]. Alterations of oxidative stress markers and apoptosis markers in the striatum after transient focal cerebral ischemia in rats // *J. Neural Transm.* – 2009. – Vol. 116, N 4. – P. 395–404.

172. Mazzotta G. [et al.]. Different cytokine levels in thrombolysis patients as predictors for clinical outcome // *Eur. J. Neurol.* – 2004. – Vol. 11, N 6. – P. 377–381.

173. McCann S.K., Dusting G.J., Roulston C.L. Early increase of Nox4 NADPH oxidase and superoxide generation following endothelin-1-induced stroke in conscious rats // *J. Neurosci. Res.* – 2008. – Vol. 86, N 11. – P. 2524–2534.

174. Mehta V., Parashar A., Udayabanu M. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress // *Physiol. Behav.* – 2017. – Vol. 171. – P. 69–78.

175. Memezawa H., Smith M.L., Siesjö B.K. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats // *Stroke*. – 1992. – Vol. 23, N 4. – P. 552–559.
176. Menze E.T. [et al.]. Potential neuroprotective effects of hesperidin on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats // *Neurotoxicology*. – 2012. – Vol. 33, N 5. – P. 1265–1275.
177. Mihara M., Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Anal. Biochem.* – 1978. – Vol. 86, N 1. – P. 271–278.
178. Min J. [et al.]. Differential neuroprotective effects of carnosine, anserine, and N-acetyl carnosine against permanent focal ischemia // *J. Neurosci. Res.* – 2008. – Vol. 86, N 13. – P. 2984–2991.
179. Miyashita T., Reed J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene // *Cell*. – 1995. – Vol. 80. – P. 293–299.
180. Nagahiro S. [et al.]. Sequential Changes in Ischemic Edema Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats: Magnetic Resonance Imaging Study // *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. – 1994. – Vol. 34, N 7. – P. 412–417.
181. Nagai K., Suda T. [Immunoregulative effects of carnosine and beta-alanine] // *Nihon Seirigaku Zasshi*. – 1986. – Vol. 48, N 6. – P. 564–571.
182. Nakagawa T. [et al.]. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$  // *Nature*. – 2000. – Vol. 403, N 6765. – P. 98–103.
183. Nayak P., Sharma S.B., Chowdary N.V.S. Aluminum and ethanol induce alterations in superoxide and peroxide handling capacity (SPHC) in frontal and temporal cortex // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2013. – Vol. 50, N 5. – P. 402–410.
184. Niizuma K. [et al.]. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* – 2010. – Vol. 1802, N 1. – P. 92–99.
185. Nishikimi M., Appaji N., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1972. – Vol. 46, N 2. – P. 849–854.
186. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95, N 2. – P. 351–358.
187. Ooboshi H. [et al.]. Postischemic Gene Transfer of Interleukin-10 Protects Against Both Focal and Global Brain Ischemia // *Circulation*. – 2005. – Vol. 111, N 7. – P. 913–919.
188. Ouyang Y.B., Giffard R.G. Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function // *Cell*

Calcium. – 2004. – Vol. 36, N 3–4. – P. 303–311.

189. Papanagiotou P., Ntaios G. Endovascular Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke // *Circ. Cardiovasc. Interv.* – 2018. – Vol. 11, N 1. – P. e005362.

190. Park H.-S. [et al.]. The neuroprotective effects of carnosine in early stage of focal ischemia rodent model // *J. Korean Neurosurg. Soc.* – 2014. – Vol. 55, N 3. – P. 125–130.

191. Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: Which subcellular compartment is involved? // *Brain Research Bulletin.* , – 2000. – P. 409–413.

192. Powers W.J. [et al.]. 2015 American Heart Association/American Stroke Association Focused Update of the 2013 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke Regarding Endovascular Treatment: A Guideline for Healthcare Professionals From the American // *Stroke.* – 2015. – Vol. 46, N 10. – P. 3020–3035.

193. Puka-Sundvall M. [et al.]. Subcellular distribution of calcium and ultrastructural changes after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 2000. – Vol. 125, N 1–2. – P. 31–41.

194. Purves D., Williams S.M. *Neuroscience.* : Sinauer Associates, 2nd Edition. 2001.681p.

195. Quillinan N., Herson P.S., Traystman R.J. Neuropathophysiology of Brain Injury // *Anesthesiol. Clin.* – 2016. – Vol. 34, N 3. – P. 453–464.

196. Radak D., Resanovic I., Isenovic E.R. Link Between Oxidative Stress and Acute Brain Ischemia // *Angiology.* – 2014. – Vol. 65, N 8. – P. 667–676.

197. Rajanikant G.K. [et al.]. Carnosine Is Neuroprotective Against Permanent Focal Cerebral Ischemia in Mice // *Stroke.* – 2007. – Vol. 38, N 11. – P. 3023–3031.

198. Rehn Crona S. Brain acidosis // *Ann. Emerg. Med.* – 1985. – Vol. 14, N 8. – P. 770–776.

199. Robaszekiewicz A., Balcerzyk A., Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells // *Cell Biol. Int.* – 2007. – Vol. 31, N 10. – P. 1245–1250.

200. Rubartelli A., Lotze M.T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox // *Trends Immunol.* – 2007. – Vol. 28, N 10. – P. 429–436.

201. Saeed S.A. [et al.]. Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke // *Exp. Brain Res.* – 2007. – Vol. 182, N 1. – P. 1–10.

202. Sanderson T.H. [et al.]. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in

- brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation // *Mol. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 47, N 1. – P. 9–23.
203. Schültke E. [et al.]. Neuroprotection following fluid percussion brain trauma: a pilot study using quercetin // *J. Neurotrauma.* – 2005. – Vol. 22, N 12. – P. 1475–1484.
204. Severin S.E. Les transformations de la carnosine dans l'organisme animal // *Acta medica URSS.* – 1939. – Vol. 2. – P. 600–602.
205. Shen Y. [et al.]. Carnosine protects against NMDA-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells through carnosine-histidine-histamine pathway and H(1)/H(3) receptors // *Biochem. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 73, N 5. – P. 709–717.
206. Shichita T. [et al.]. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing  $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15, N 8. – P. 946–950.
207. Shichita T., Ito M., Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection // *Front. Cell. Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P. 319
208. Shutenko Z. [et al.]. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 57, N 2. – P. 199–208.
209. Singhal A.B. [et al.]. Ischemic Stroke: Basic Pathophysiology and Neuroprotective Strategies // *Acute Ischemic Stroke* / R.G. González [et al.], eds : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, – 2011. Second Edi. – P. 1–24.
210. Spagnuolo C., Moccia S., Russo G.L. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 153. – P. 105–115.
211. Stvolinsky S.L. [et al.]. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 1999. – Vol. 19, N 1. – P. 45–56.
212. Suganthy N. [et al.]. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions // *Biomed. Pharmacother.* – 2016. – Vol. 84. – P. 892–908.
213. Sun K. [et al.]. Anti-Aging Effects of Hesperidin on *Saccharomyces cerevisiae* via Inhibition of Reactive Oxygen Species and UTH1 Gene Expression // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2012. – Vol. 76, N 4. – P. 640–645.
214. Tanahashi N. Cerebral Microvascular Reserve for Hyperemia // *Microcirculation in Circulatory Disorders*. Tokyo: Springer Japan, – 1988. – P. 495–497.
215. Tang Z. [et al.]. Dietary flavonoid intake and the risk of stroke: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies // *BMJ Open.* – 2016. – Vol. 6, N 6. – P. e008680.
216. Tripathi T. [et al.]. Histamine-Cytokine and Histamine-Antibody Network in



- Immune Regulation // Biomedical Aspects of Histamine / N. Khardori, R.A. Khan, T. Tripathi eds. Dordrecht: Springer Netherlands, – 2010. – P. 421–436.
217. Tung-Hu T., Yen-Fei C. Determination of Unbound Hesperetin in Rat Blood and Brain by Microdialysis Coupled to Microbore Liquid Chromatography // *J. Food Drug Anal.* – 2000. – Vol. 8, N 4. – P. 331–336.
218. Ukeda H. [et al.]. Effect of carnosine and related compounds on the inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by modification of fructose and glycolaldehyde // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2002. – Vol. 66, N 1. – P. 36–43.
219. Vila N. [et al.]. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke // *Stroke.* – 2003. – Vol. 34, N 3. – P. 671–5.
220. Viswanatha G.L. [et al.]. Hesperidin Ameliorates Immobilization-Stress-Induced Behavioral and Biochemical Alterations and Mitochondrial Dysfunction in Mice by Modulating Nitrgergic Pathway // *ISRN Pharmacol.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–8.
221. Viviani B. [et al.]. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, N 25. – P. 8692–8700.
222. Waisman A., Hauptmann J., Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases // *Acta Neuropathol.* – 2015. – Vol. 129, N 5. – P. 625–37.
223. Wang D.M. [et al.]. Protective effects of hesperidin against amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) induced neurotoxicity through the voltage dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated mitochondrial apoptotic pathway in PC12 cells // *Neurochem. Res.* – 2013. – Vol. 38, N 5. – P. 1034–1044.
224. Warner D.S. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain // *J. Exp. Biol.* – 2004. – Vol. 207, N 18. – P. 3221–3231.
225. Wehr N.B., Levine R.L. Quantification of Protein Carbonylation // *Cell Senescence Methods in Molecular Biology.* / L. Galluzzi [et al.] eds. Totowa, NJ: Humana Press, – 2013. – P. 265–281.
226. Woodruff T.M. [et al.]. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke // *Mol. Neurodegener.* – 2011. – Vol. 6, N 1. – P. 11.
227. Xu D. [et al.]. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, N 6. – P. 1123.
228. Yamato M., Egashira T., Utsumi H. Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 35, N 12. – P. 1619–1631.
229. Yoneda T. [et al.]. Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2-dependent Mechanism in Response to the ER Stress // *J. Biol. Chem.* . – 2001. – Vol.

276, N 17. – P. 13935–13940.

230. Zahuranec D.B., Majersik J.J. Percentage of acute stroke patients eligible for endovascular treatment // *Neurology*. – 2012. – Vol. 79, N 13 SUPPL. 1. – P. S22–S25

231. Zhang J. [et al.]. IL-17A contributes to brain ischemia reperfusion injury through calpain-TRPC6 pathway in mice // *Neuroscience*. – 2014. – Vol. 274. – P. 419–428.

232. Zhao X. [et al.]. Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage // *J. Neurosci*. – 2015. – Vol. 35, N 32. – P. 11281–11291.

233. Zhivotovsky B., Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community // *Cell Calcium*. – 2011. – Vol. 50, N 3. – P. 211–221.

234. Zipfel G.J., Lee J.M., Choi D.W. Reducing calcium overload in the ischemic brain // *N. Engl. J. Med*. – 1999. – Vol. 341, N 20. – P. 1543–1544.