

СИЛАЧЁВ ДЕНИС НИКОЛАЕВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ НА МОДЕЛИ
ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

03.00.13 – физиология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2009

Работа выполнена в лаборатории структуры и функции митохондрии НИИ физико-химической биологии им А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова (заведующий – д.б.н., профессор Д.Б.Зоров), на факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова (декан – профессор, академик РАН В.П. Скулачёв).

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и функции митохондрии НИИ физико-химической биологии им А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

Николай Константинович Исаев

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Ольга Сергеевна Тарасова;

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела исследования мозга научного центра неврологии РАН

Ирина Николаевна Шаронова

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН

Защита состоится 23 ноября 2009 г. в 15 час 30 мин на заседании диссертационного совета Д501.001.93 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы 1/12, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова

Автореферат разослан 22 октября 2009 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.001.93

доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Среди современных медико-социальных проблем инсульт занимает одно из ведущих мест. Рост числа инсультов головного мозга среди трудоспособного населения нашей страны является на данный момент одним из самых острых вопросов отечественного здравоохранения. В настоящее время в России инсульт ежегодно переносят свыше 450 тыс. человек. Среди причин смерти он занимает второе место. Показатели заболеваемости и смертности от инсульта среди лиц трудоспособного возраста в России увеличились за последние 10 лет более чем на 30%. Ранняя 30-дневная летальность после инсульта составляет 34,6%, а в течение года умирает примерно половина заболевших, что составляет более 200 тыс. человек (Гусев и др., 2007; Виленский и Яхно, 2006).

Однако на сегодняшний день все имеющиеся нейропротекторные препараты, испытанные в мультифокальных клинических исследованиях, недостаточно эффективны (Rother, 2008). Поэтому разработка новых подходов к терапии и профилактике инсульта является острейшей задачей медицины.

Так как в процессе ишемического повреждения мозга задействовано несколько различных патологических механизмов, то очевидно, что нейропротективная терапия должна быть направлена на различные мишени, принимающие участие в патологических процессах. Поэтому нами было выбрано три различных направления для нейропротекторной защиты: ингибиторы апоптоза, митохондриально-адресованные антиоксиданты и регуляторные пептиды.

Целью данной работы было исследование динамики ишемического инфаркта у крыс на модели перекрытия средней мозговой артерии (СМА) с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), а также изучения возможности коррекции нарушений, вызванных ишемией, при использовании новых фармакологических препаратов.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие **задачи:**

1. Исследовать динамику формирования фокального очага ишемического повреждения на модели перекрытия СМА с помощью метода МРТ.
2. Исследовать влияние внутрибрюшинного введения хлорида лития после индукции ишемии головного мозга на развитие ишемического очага и неврологического дефицита.
3. Изучить нейропротекторные свойства пептидов ГК-2 и RGP на модели фокальной ишемии головного мозга.

4. Оценить влияние митохондриально-адресованных антиоксидантов семейства SkQ на развитие ишемического очага и неврологического дефицита.

Научная новизна и практическая значимость. В данной диссертационной работе впервые осуществлен широкий комплексный подход к исследованию процесса формирования ишемического повреждения головного мозга крыс с использованием метода МРТ и выполнен сравнительный анализ двух методов оценки области повреждения (МРТ и TTC-окрашивание) в сопоставлении с данными об уровне неврологического дефицита, оцененного в поведенческих тестах.

Установлены сроки формирования ишемического очага в модели перекрытия СМА нитью. Проведен последовательный анализ на всех стадиях процесса формирования ишемического очага с использованием МР-изображений, начиная с первых минут ишемии и заканчивая двухнедельным сроком.

Впервые на модели фокальной ишемии мозга, вызванной перекрытием СМА, выявлено нейропротекторное действие пептидов PGP и ГК-2. Данные пептиды уменьшали развитие ишемического нейродеструктивного процесса и способствовали снижению неврологического дефицита в постишемическом периоде.

В исследовании влияния митохондриально-адресованных антиоксидантов семейства SkQ (SkQ1, SkQR1 и SkQRB) впервые показано, что SkQR1 очень эффективно защищает ткань мозга от ишемии, снижает неврологический дефицит при введении до или после индукции ишемии методом перекрытия СМА. Также выявлены некоторые молекулярные механизмы защитного действия SkQR1.

Таким образом, полученные нами данные, а также примененные в исследованиях оригинальные методические разработки имеют важное научно-практическое значение для расширения существующих представлений о патоморфологических и патофизиологических процессах, происходящих в очаге ишемического повреждения головного мозга. Результаты исследования позволяют рекомендовать пептиды PGP и ГК-2, а также митохондриально-адресованный антиоксидант SkQR1 для дальнейших доклинических испытаний с целью выявления наиболее эффективных доз, способов и сроков введения препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Перекрытие средней мозговой артерии вызывает образование инфаркта в области коры, включая сенсомоторную область, и стриатума, что сопровождается стойким нарушением сенсомоторных функций мозга. При этом процесс образования

инфаркта имеет динамический характер и его основное формирование у крыс происходит к 24-м часам после индукции ишемии.

2. Ионы лития, пептиды RGP и ГК-2 предотвращают негативные последствия ишемии головного мозга, снижая объем инфаркта и выраженность неврологического дефицита.
3. Митохондриально-адресованные антиоксиданты семейства SkQ уменьшают объем ишемического повреждения и снижают неврологический дефицит.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на Kuopio Stroke Symposium 2007 (Куопио, Финляндия, 2007); III Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Пушино, 2007); XV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2008); Конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург, 2008); International Multidisciplinary Symposium "From experimental biology to preventive and integrative medicine" (Судак, Украина, 2008); открытом семинаре отдела биоэнергетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ (Москва, 2009) и на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ (Москва, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в ведущих рецензируемых журналах и 5 тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 206 страницах, содержит 48 рисунков и 1 таблицу. Список литературы включает 465 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была выполнена на самцах белых нелинейных крыс весом 300-350г (n=301). Животных содержали в стандартных условиях вивария с неограниченным доступом к пище и воде.

Ишемию головного мозга крысы вызвали введением покрытой силиконом нейлоновой нити в правую среднемозговую артерию, как было описано ранее (Longa et al., 1989; Koizumi et al., 1986). Перекрытие кровотока сохранялось в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне средней мозговой артерии. Во время и после операции температура тела животного поддерживалась на

уровне $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Ложнооперированные животные (ЛО) подвергались тем же процедурам, за исключением перерезания сосудов и введения нити.

Объем инфаркта головного мозга определяли на 1-е или 7-е сутки после моделирования инсульта морфометрическим анализом цифровых изображений, полученных методом МРТ, или сканированием срезов мозга, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом (ТТС метод). Все МРТ эксперименты были выполнены на приборе BioSpec 70/30 (Bruker, Germany) с индукцией магнитного поля 7 Тл и градиентной системой 105 мТл/м.

Изучаемые вещества

Изучаемые препараты вводили внутривенной (в/в) инъекцией в объеме 1 мл или закапывали интраназально (и/н) в объеме 20 мкл, по 4 мкл в каждую ноздрю с интервалом в 4 мин. В качестве контроля к изучаемым фармакологическим препаратам использовали физиологический раствор, который вводили по той же схеме и в равном объеме.

Хлорид лития вводили в/в сразу после начала реперфузии в дозе 3 ммоль/кг.

Пептид PGP был синтезирован в НИИ молекулярной генетики РАН в отделе химии физиологически активных веществ. PGP вводили в/в через 1 ч после начала реперфузии, и далее на 1 и 2 сутки после операции в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг.

Пептид ГК-2 был предоставлен ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН. ГК-2 вводили в/в через 1 ч после начала реперфузии, и далее на 1-2 или 1-5 сутки после операции в дозе 1 мг/кг.

Митохондриально-адресованные антиоксиданты семейства SkQ были предоставлены НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ. SkQ1 вводили по двум схемам: в первой за 4 дня до операции делали в/в инъекцию в дозе 1 мкмоль/кг; во второй на 5, 4 и 3 сутки до операции делали в/в инъекцию в дозе 0,1 мкмоль/кг ежедневно. SkQR1 вводили в/в в дозах 0,5, 1 и 2 мкмоль/кг за 1 сутки до моделирования ишемии головного мозга, а также сразу после начала реперфузии закапывали и/н в дозах 20 нмоль/кг и 1 мкмоль/кг. SkQRB вводили в/в в дозах 1 и 2 мкмоль/кг за 1 сутки до моделирования ишемии головного мозга, а C12R19 по той же схеме в дозе 1 мкмоль/кг.

Поведенческие тесты

Тестирование животных во всех поведенческих тестах проводилось за сутки до начала индукции ишемии для выявления наличия базового уровня неврологического

дефицита и на 1, 4 и 7 или 1-7 послеоперационные дни в зависимости от протокола введения исследуемого препарата.

Для оценки неврологических нарушений, вызванных перекрытием СМА, использовали тест «Стимулирования конечностей», основанный на 14-бальной шкале (De Ryck et al., 1989), в модификации (Jolkkonen et al., 2000). Итоговый балл в ней формируется как сумма баллов в семи тестах, оценивающих ответ задних и передних конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию и наличие определённых рефлексов. Для оценки нарушений в работе конечностей использовали следующую систему подсчета: 2 балла – крыса полностью выполняла испытание; 1 балл – крыса выполняла испытание с задержкой в более чем 2 сек и/или не полностью; 0 баллов – крыса не отвечала на стимулирование конечности. Максимально возможное суммарное количество баллов равно 14 для каждой стороны тела и соответствует отсутствию нарушений.

Для оценки сенсомоторной функции передних и задних конечностей в координации и интеграции во время движения животного использовали тест «Сужающаяся дорожка» (beam-walking test). Крыс обучали в течение 3-х дней пересекать «сужающуюся дорожку» перед индукцией ишемии. Животных тестировали на 7-й день после ишемии. Установка теста «Сужающаяся дорожка» представляет собой две сужающиеся доски, расположенные друг под другом, где нижняя доска имеет борта для расположения конечностей животного во время соскальзывания с верхней доски. Движение крыс записывалось на видеокамеру, и анализировалось количество соскальзываний с верхней доски на нижнюю для поврежденных (являющихся контралатерально расположенными относительно поврежденного полушария) передней и задней конечности по формуле: количество соскальзываний/общее количество шагов (Schallert et al., 2002).

В тесте "цилиндр" оценивали степень асимметрии использования животным передних конечностей в течение спонтанного исследования стенок цилиндра (Schallert et al., 2000).

Вестерн-блоттинг. Исследование проводилось по протоколу, описанному DuBois R.N. et al., 1996. При этом использовались первичные антитела к pGSK-3 β (1: 1000; Cell Signaling), эритропоэтину (1:1000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), а также видоспецифичные вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:30000, Caltag).

Статистическая обработка результатов. Обработку результатов осуществляли при

помощи статистической программы STATISTICA 6 (StatSoft. Inc., USA). Данные представлены на гистограммах и в таблице в виде средних значений \pm ошибка среднего, n – объем выборки. Нормальность распределения признака в выборке оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка W . Для сравнения данных в поведенческих тестах использовали U -критерий Манна-Уитни (для независимых выборок). Для оценки статистической значимости различий объемов инфаркта использовали T -критерий Стьюдента. Различия признавались статистически значимыми при допустимой вероятности ошибки $< 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование формирования ишемического очага с помощью метода МРТ и окраски ТТС с анализом моторного дефицита в передних конечностях крыс

В ходе эксперимента животных разделили на 2 группы: ИШ – крысы, перенесшие перекрытие СМА ($n=8$); ЛО – ложнооперированные животные ($n=7$). Результаты исследования зоны ишемического повреждения, вызванного перекрытием среднемозговой артерии нитью, с помощью МРТ и окраски 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом показали, что в данной модели ишемии кора, включая сенсомоторную область, и стриатум являются основными областями повреждения. При исследовании головного мозга крыс через сутки после ишемии зона поражения определялась с помощью МРТ как повышение сигнала (гиперинтенсивность) на T2-взвешенных изображениях по отношению к интактному белому веществу за счет развития цитотоксического отека. По результатам морфометрического анализа МР-изображений на 1-е сутки объем пораженного полушария головного мозга был на $14\pm 3\%$ больше не пораженного вследствие отека, вызванного ишемией. На 7-е сутки после инициации ишемии объем пораженного полушария существенно уменьшился и был на $3\pm 1,2\%$ больше объема контралатерального полушария, по данным МРТ прослеживалось снижение степени гиперинтенсивности зоны поражения по сравнению с первыми сутками после ишемии. При учете степени отека поврежденной зоны истинные размеры пораженной области на 1-е и на 7-е сутки как по данным МРТ, так и ТТС метода были довольно близки по абсолютным значениям (таблица). В группе ложнооперированных животных при МРТ исследовании и ТТС методом повреждения не были обнаружены. По данным МРТ на первые сутки объем повреждения от всего полушария составил $55\pm 3,3\%$, а на 7-е сутки $59,3\pm 3,3\%$. Эти данные указывают на то, что в используемой нами модели основной процесс формирования ишемического очага

происходит в течение первых суток после ишемии.

Количественные данные объемов очагов и их локализация, полностью коррелировали с сенсомоторными нарушениями конечностей этих животных, оцененных с помощью поведенческих тестов. В тесте «Цилиндр» перед индукцией ишемии независимое использование контра- и ипсилатеральной передней лапы было 19% и 13% соответственно от всех касаний стенки цилиндра. На 7-й день после операции у крыс с ишемией использование поврежденной лапы (контралатеральной поврежденному полушарию головного мозга) статистически значимо снижалось в 2 раза (до 10%). Это снижение компенсировалось повышением использования ипсилатеральной лапы в 4 раза, что по сравнению с ЛО группой составляло 53% ($P < 0,05$). Следует отметить, что через 7 суток после ишемии наблюдалась не полная, но статистически значимая компенсация неврологического дефицита в тесте «Стимулирования конечностей» с $4 \pm 0,9$ до $5,4 \pm 1,1$ ($P < 0,05$) баллов по сравнению с 4 сутками. Параллельно с развитием изменения неврологического дефицита у крыс с ишемией наблюдалось устойчивое снижение массы тела, которое было максимальным ($18 \pm 3,6\%$ от массы до операции) на 4-й день и регрессировало к 7-м суткам ($9,3 \pm 3,3\%$). В группе ЛО снижение массы тела наблюдалось только в первые два дня после операции и было незначительным.

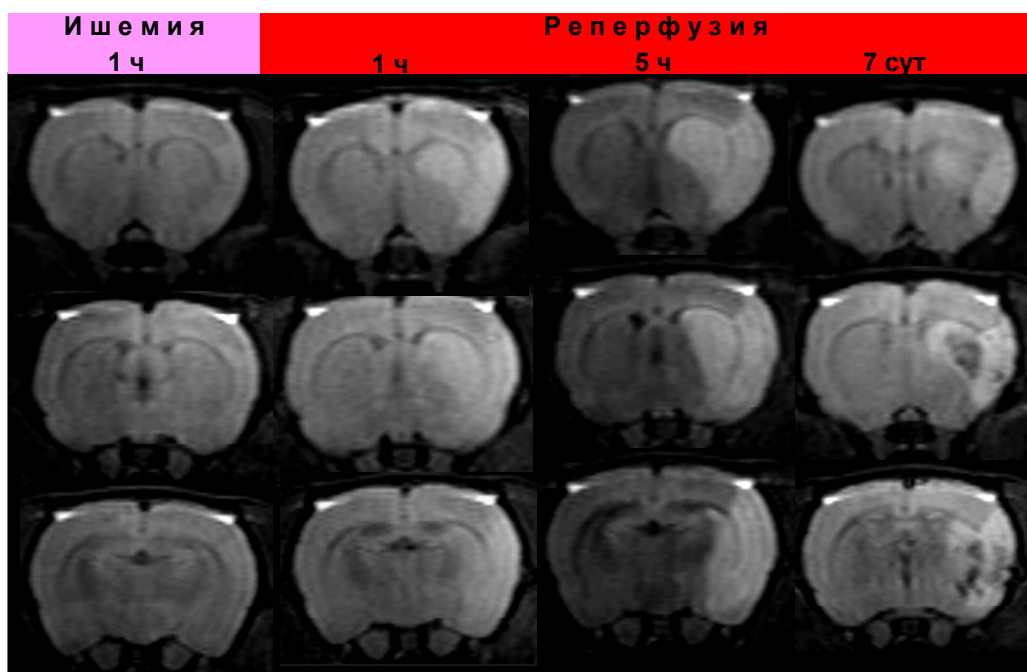
Таблица. Объемы поражения коры и стриатума при фокальной ишемии головного мозга крыс с учетом степени отека пораженной зоны.

Время после ишемии	Размер поражения в зонах мозга в мм ³ (метод МРТ)		Размер поражения в зонах мозга в мм ³ (ТТС- метод)	
	кора	стриатум	кора	стриатум
Сутки после ишемии	192 ± 28	$57 \pm 3,7$	-	-
7 суток после ишемии	199 ± 29	$47 \pm 5,3$	217 ± 25	$57 \pm 6,9$

Исследование динамики формирования ишемического очага методом МРТ

Для исследования динамики формирования очага ишемического повреждения крысам ($n=6$) перекрывали нитью СМА и через 30 и 60 мин проводили МРТ-исследование. Далее животное доставали из томографа и восстанавливали кровоток, извлекая нить. После реперфузии МРТ-исследование проводилось через 1, 2, 3, 5 ч, а также на 1-е и 7-е сутки.

А



Б

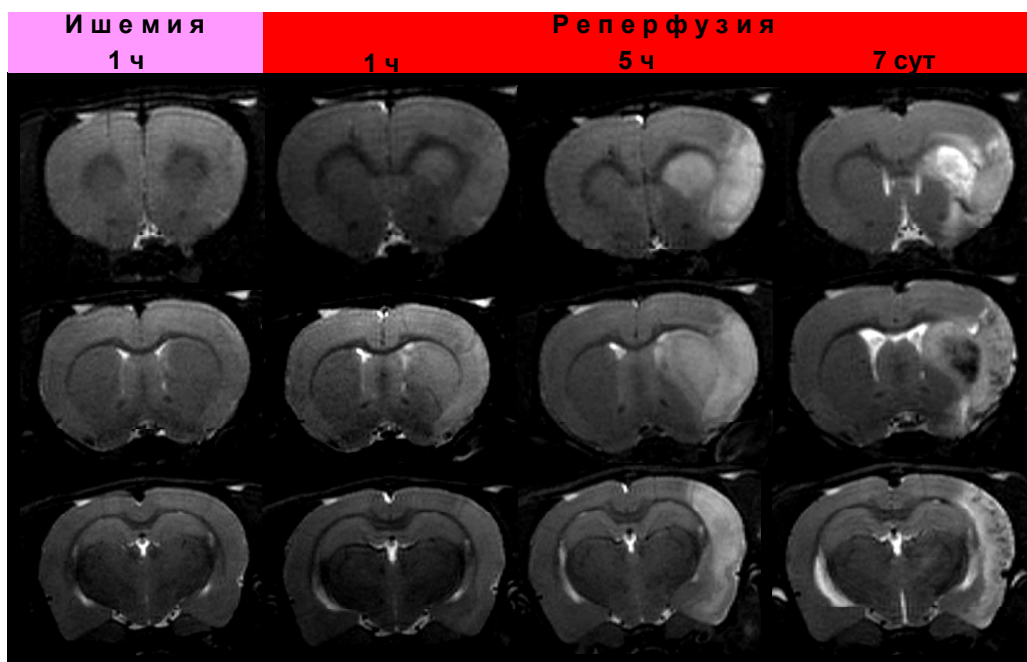


Рис. 1. Динамика формирования фокального ишемического очага. На рисунке представлены МР-изображения трех одинаковых срезов репрезентативного мозга, сделанных для разных областей мозга. А – диффузионно-взвешенное изображение; Б – T2 взвешенное изображение.

Анализ диффузионно-взвешенных МР-изображений выявил наличие областей с гиперинтенсивным сигналом в области стриатума и коры уже через 30 мин ишемии. Через 60 мин ишемии сигнал становился более четким. После начала реперфузии гиперинтенсивность сигнала резко увеличивалась, и ее максимум приходился на 3-5 часов (рис 1А). Данная динамика изменения гиперинтенсивности сигнала свидетельствует об активно происходящих в это время патологических процессах связанных с

цитотоксическим отеком клеток. К 7-м суткам интенсивность сигнала снижалась, местами на МР-изображениях были области с гипоинтенсивным сигналом в стриатуме и в коре. Расположение этих областей совпало с расположением кистозных трансформаций, выявленных с использованием режима подавления сигнала воды.

Анализ T2-взвешенных изображений, полученных во время ишемии, не выявил изменения сигнала через 30 и 60 мин. Изменение интенсивности сигнала происходило только через час после начала реперфузии, что, по-видимому, связано с первичным повреждением эндотелия капилляров. Далее гиперинтенсивность сигнала повышалась и достигала максимума к 1-м суткам. На 7-е сутки T2-взвешенные изображения были гетерогенными, имелись области как с гиперинтенсивным сигналом (с повышенным содержанием жидкости), так и с гипоинтенсивным сигналом (рис. 1Б). Морфометрический анализ T2-взвешенных изображений выявил динамику формирования ишемического очага (рис. 2). Из графика видно, что максимальный объем зоны повреждения ишемического очага приходился на 1-е сутки, а к 7-м суткам он немного снижался, что связано с уменьшением отека ткани. Таким образом, видно, что образование ишемического очага является динамическим процессом. Во временном промежутке с 1 до 3 ч после реперфузии формирование очага происходило на 55% по сравнению с 1-ми сутками, а с 3-5ч зона поражения возрастала еще на 16%. Полученные нами результаты указывают на наличие в нашей модели обширной зоны пенумбры, за счет которой идет увеличение объема инфаркта.

Также, во время изучения динамики формирования ишемического повреждения через 5 часов после начала реперфузии изучали нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Первоначально получали T1-взвешенные изображения, где области инфаркта соответствовал гипоинтенсивный сигнал. Далее крысам внутривенно вводили контраст – гадолиний. Гадолиний является парамагнитным металлом, который уменьшает времена релаксации T1 и T2 протонов и таким образом усиливает сигнал на T1-взвешенных изображениях. В норме гадолиний не проходит через гематоэнцефалический барьер, поэтому он проникает в головной мозг только в тех местах, где барьер нарушен. На T1-взвешенных контраст-усиленных изображениях через 5 мин после введения контраста в области стриатума и коры сигнал становился более гиперинтенсивным у всех животных (рис. 3). Через 20 мин происходило еще большее накопление контраста в области повреждения. Полученные нами результаты хорошо

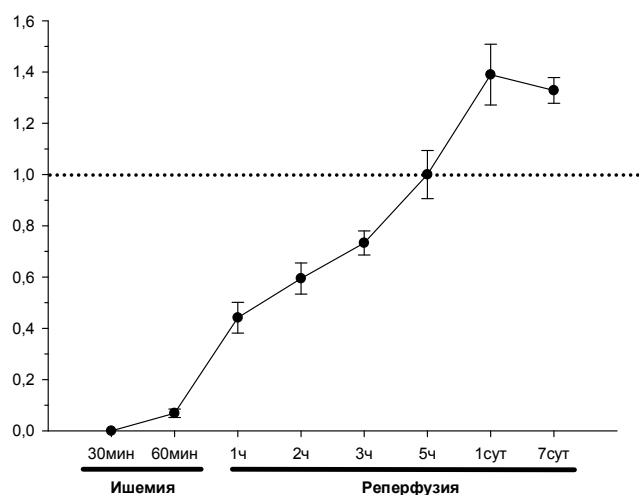


Рис. 2. Динамика изменения объема ишемического повреждения, измеренного на T2-взвешенных изображениях. Объемы нормированы на 5 ч точку.

согласуются с литературными данными, что через 5 ч реперфузии происходит нарушение ГЭБ (Neumann-Haefelin et al., 2000).

Таким образом, нами была отработана фокальная модель ишемии головного мозга с воспроизводимой локализацией и объемом ишемического повреждения. Изучена динамика формирования объема инфаркта. Показаны функциональные последствия ишемического повреждения бассейна СМА, что выражалось в асимметрии использования передних конечностей в тесте «Цилиндр» и падение балла неврологического статуса в тесте «Стимулирование конечностей». Можно заключить, что выбранная нами модель соответствует требованиям, предъявляемым к моделям ишемии головного мозга для изучения нейропротекторных препаратов.

Исследование нейропротекторной активности ионов лития

Во второй части работы мы изучали возможность фармакологической коррекции нарушений, вызванных ишемией головного мозга, с помощью фармакологических воздействий препаратами, имеющими различные механизмы действия. Первая задача, которая перед нами стояла – протестировать нашу экспериментальную модель перекрытия СМА на возможность коррекции ишемического повреждения препаратом с известными нейропротекторными свойствами и сравнить полученные результаты с данными других

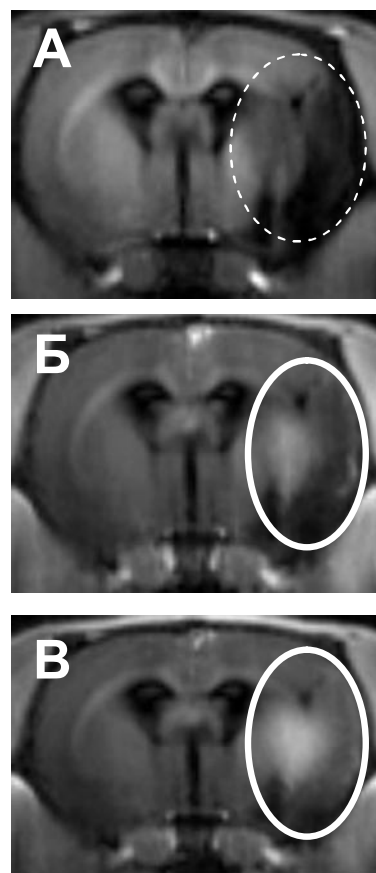


Рис. 3. Нарушение ГЭБ через 5 ч после реперфузии на T1-взвешенных изображениях (T1ВИ). А – T1ВИ до введения контраста; Б – T1ВИ через 5 мин после введения контраста; В - T1ВИ через 20 мин после введения контраста. Пунктирным овалом отмечена ишемическая область (гипоинтенсивный сигнал). Сплошным овалом отмечена ишемическая область с нарушением ГЭБ (гиперинтенсивный сигнал).

исследований. В качестве такого вещества нами был выбран хлорид лития LiCl, так как механизм его антиапоптотического действия был достаточно хорошо изучен для патологий ЦНС (Rowe and Chuang, 2004).

Нами исследовалась нейропротекторная активность LiCl в дозе 3 ммоль/кг при внутрибрюшинном введении сразу после начала реперфузии. По результатам морфометрического анализа ТТС-изображений размер ишемического очага у животных, которым инъецировали только физиологический раствор, был равен $286 \pm 29,5 \text{ мм}^3$ (n=5). При лечении LiCl наблюдалось достоверное уменьшение очага повреждения, в этом случае его объем был $140 \pm 22 \text{ мм}^3$ (n=6). По усредненным данным объем очага уменьшался на 51% ($P < 0,01$).

Количественные данные, указывающие на уменьшение объема очага у животных, которым инъецировали LiCl, полностью коррелировали с данными неврологического статуса, оцененного в тесте «Стимулирование конечностей». Для крыс, получавших LiCl, неврологический дефицит был в 4 раза ниже по сравнению с группой, которой инъецировали только физиологический раствор, и составлял 6 баллов ($P < 0,01$) на 1-е сутки после операции.

Полученные нами результаты полностью совпадают с данными Рен и соавторов, использовавших идентичную модель и концентрацию препарата, где уменьшение объема ишемического очага составило 50%, а также отмечалось значительное снижение неврологического дефицита (Ren et al., 2003). Таким образом, полученные нами результаты указывают на возможность коррекции последствий ишемии головного мозга наряду с нормализацией функционального состояния ЦНС в постишемическом периоде, а также подтверждают данные о нейропротекторном действии ионов лития.

Исследование нейропротекторной активности пептида PGP

В данном разделе нашей работы было проведено исследование нейропротекторных свойств пептида PGP в дозе 0,1 и 0,5 мг/кг, который вводили в/б через 1 ч после начала реперфузии, а далее на 1 и 2 сутки после операции. Выбор препарата сделан на основании его высокой нейропротекторной активности, показанной ранее *in vitro* (Сафарова, 2003).

Поведенческие тесты проводили за сутки до индукции ишемии. На 4-й день после индукции ишемии животные были исследованы при помощи теста «Стимулирования конечностей», а на 7-й день тестами «Стимулирования конечностей», «Цилиндр» и «Сужающаяся дорожка». На 7-е сутки после операции животных декапитировали и срезы мозга окрашивали ТТС.

Проведенный подробный морфометрический анализ ишемического повреждения в коре и стриатуме по ТТС-изображениям показал, что в контрольной группе, которой инъецировали в/б только физиологический раствор, объем инфаркта в коре был равен $115,2 \pm 35,5 \text{ мм}^3$ ($n=6$). При лечении пептидом в дозе 0,1 мг/кг наблюдалось значительное уменьшение объема инфаркта в коре, который составил $62,5 \pm 40 \text{ мм}^3$ ($n=10$), что соответствует по усредненным данным снижению очага инфаркта на 45% по сравнению с контролем. В группе животных, которым инъецировали 0,5 мг/кг PGP, очаг был равен $113 \pm 43 \text{ мм}^3$ ($n=9$). Различий по объему инфаркта в стриатуме между группами выявлено не было, объем ишемического повреждения для всех групп составил в среднем $42 \pm 2,5 \text{ мм}^3$.

Тест «Стимулирования конечностей» выявил снижение неврологического дефицита на 4-е и 7-е сутки после ишемии у животных, получавших PGP. Однако на 4-й день восстановление было незначительным, и повышение составило 1 и 1,5 балла для групп, леченных дозой пептида 0,1 и 0,5 мг/кг, соответственно, по сравнению с контролем. На 7-й день тенденция была более выраженной, леченые крысы имели по 6,7 и 7,4 баллов для доз 0,1 и 0,5 мг/кг, соответственно, тогда как не леченая группа набрала только 5,3 балла.

Сходная картина была получена на 7-й день после операции в тесте «Сужающаяся дорожка». В данном тесте оценивался сенсомоторный и моторно-координационный дефицит для поврежденной передней и задней конечностей одновременно. Данные представляли как процентное соотношение количества соскальзываний для каждой конечности от общего числа шагов. Для задней конечности процент соскальзывания уменьшался на 18,6% и 23% для животных получавших PGP в дозе 0,1 и 0,5 мг/кг, соответственно, по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор. Для передней конечности было отмечено снижение процента соскальзывания на 33% только у животных, леченых PGP в дозе 0,1 мг/кг, по сравнению с контрольной группой.

В тесте «Цилиндр» за 1 сутки до индукции ишемии независимое использование левой передней лапы или одновременно с правой лапой, было одинаково и составляло в среднем $51,5 \pm 3,7\%$ для всех групп животных. На 7-й день после операции у крыс всех групп, использование поврежденной левой лапы (является контралатеральной поврежденному полушарию головного мозга) снижалось. Это снижение было гораздо менее выражено у крыс, которым после ишемии в течение трех дней вводили PGP. У этих животных использование левой лапы увеличивалось в 2 раза в обеих группах независимо от дозы PGP по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор, и составило $24,5 \pm 3,5\%$.

Во всех поведенческих тестах данные, полученные для ложнооперированных животных не имели статистически значимых отличий от данных, полученных за 1 сутки до операции.

Таким образом, наиболее выраженный нейропротекторный эффект PGP был выявлен для дозы 0,1 мг/кг, который проявлялся как в снижении объема ишемического повреждения коры, так и в значительном уменьшении неврологического дефицита у животных, оцененного во всех использованных поведенческих тестах. PGP в дозе 0,5 мг/кг снижал выраженность неврологического дефицита, но не оказывал влияние на объем ишемического повреждения. На основании полученных данных мы предполагаем, что PGP может являться новым низкомолекулярным фармакологическим агентом с выраженными нейрозащитными свойствами.

Исследование нейропротекторной активности пептида ГК-2

В ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН был синтезирован NGF-подобный пептид ГК-2, являющийся аналогом фрагмента 4-й петли NGF.

Пептид ГК-2 исследовали в двух сериях экспериментов, отличающихся продолжительностью введения препарата. Для обеих серий экспериментов поведенческое тестирование крыс проводили за 1 сутки до операции. В первой серии ГК-2 вводили в/б в дозе 1 мг/кг через 1 ч после начала реперфузии, а далее на 1 и 2 сутки после операции (всего 3 инъекции). Исследование неврологического дефицита проводили на 4-е и 7-е сутки в тесте «Стимулирования конечностей» и на 7-е сутки в тесте «Цилиндр». Во второй серии ГК-2 вводили в/б в дозе 1 мг/кг через 1 ч после начала реперфузии и на 1-5 сутки после операции (всего 6 инъекций). В ходе экспериментов проводили мониторинг степени нарушения неврологического дефицита в тесте «Стимулирования конечностей» в течение семи суток, а также в тесте «Цилиндр» на 7-е сутки после операции. МРТ исследование головного мозга животных (для 1-й серии) и ТТС-окрашивание (для 2-й серии) выполняли на 7-е сутки после ишемии.

Для 1-й серии по результатам морфометрического анализа МР-изображений размер ишемического очага у животных, которым инъецировали только физиологический раствор, был равен 266 ± 20 мм³ (n=12). При лечении ГК-2 наблюдалась хорошая тенденция уменьшения очага повреждения, в этом случае его объем был 222 ± 16 мм³ (n=12). По усредненным данным объем очага уменьшался на 16,5%. В тесте «Стимулирования конечностей» животные контрольной группы набирали $3 \pm 0,4$ и $4,5 \pm 0,4$ на 4-й и 7-й день после ишемии, соответственно. Трехкратное введение ГК-2 позволило достоверно

улучшить эти показатели до $5,9 \pm 0,6$ для 4-го дня после ишемии и $7,7 \pm 0,8$ для 7-го дня ($P < 0,01$). В тесте «Цилиндр» на 7-е сутки после операции у крыс контрольной группы частота использования передней поврежденной лапы и одновременное использование двух передних лап снижалось в 5 и 1,8 раз соответственно по сравнению с дооперационным уровнем. Это снижение было гораздо менее выражено у крыс, которым после ишемии вводили ГК-2. В этом случае использование передней поврежденной лапы статистически значимо уменьшалось всего в 1,6 ($P < 0,05$), а одновременное использование в 1,2 раза.

Во 2-й серии экспериментов морфометрический анализ срезов, окрашенных ГТС, выявил, что объем инфаркта у животных, получавших физиологический раствор, был равен $298,5 \pm 13,9$ мм³ ($n=10$). При лечении ГК-2 наблюдалось статистически значимое уменьшение очага повреждения, в этом случае его объем был $251,9 \pm 18,7$ мм³ ($n=12$) ($P < 0,05$). По усредненным данным объем очага уменьшался на 15,6%. Тест «Стимулирования конечностей» показал, что лечение в послеишемический период препаратом ГК-2 достоверно снижает неврологический дефицит у ишемизированных животных. Начиная с 4-го послеоперационного дня у животных, получавших ГК-2, наблюдалось быстрое восстановление сенсомоторных функций конечностей по сравнению с контрольной группой, получавшей только физиологический раствор в постишемический период (рис. 4).

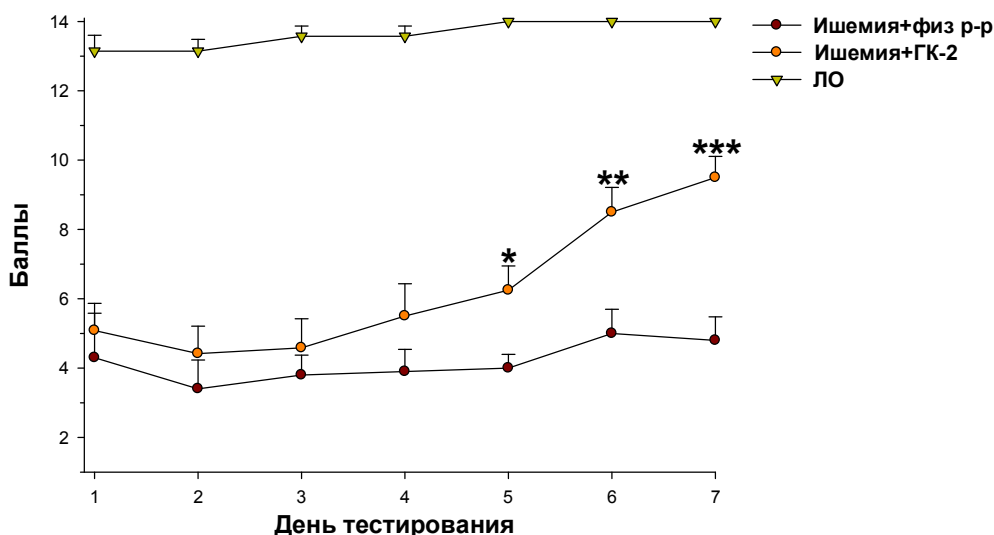


Рис. 4. Влияние в/б инъекций пептида ГК-2 в течение 6 дней после ишемии на снижение неврологического дефицита в тесте «Стимулирования конечностей».

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ – (*U-тест* Манна Уитни) по сравнению с группой «Ишемия+физ. р-р».

Условные обозначения: ЛО – ложнооперированные животные.

Анализ асимметрии использования передних конечностей в тесте «Цилиндр» показал, что на 7-е сутки после операции у крыс контрольной группы использование поврежденной лапы снижалось на 60%, а одновременное использование двух лап – на 67% по сравнению с ложнооперированными крысами. Это снижение было гораздо менее выражено у крыс, которым после ишемии в течение 6 дней вводили ГК-2. Так, использование поврежденной конечности уменьшалось только на 27%, а одновременное использование двух лап – на 34% ($P < 0,05$).

Таким образом, более длительное введение ГК-2 сопровождалось и более выраженным снижением неврологического дефицита. Полученные данные говорят о значительном влиянии ГК-2 на пластические процессы, происходящие в мозге, связанные с восстановлением сенсомоторных функций в постишемический период. Эти результаты хорошо согласуются с данными о роли NGF в нейропластичности и репарации мозга (Varon and Conner, 1994; Alleva and Francia, 2009; Spedding and Gressens, 2008; Frade and Barde, 1998; Lessmann, 1998; Nefti, 1994).

По результатам данного исследования препарат ГК-2 проявлял ярко выраженную антиишемическую активность, которая выражается как в снижении объема пораженного участка головного мозга, так и в достоверном снижении неврологического дефицита у животных, которым в постиешемический период инъецировали препарат.

Исследование нейропротекторной активности митохондриально-направленных антиоксидантов

При выборе концентраций и схем введения препаратов мы исходили из результатов, полученных ранее на крысиных моделях инфаркта миокарда и ишемии почки, где наибольший эффект проявлялся при предварительном введении препарата до индукции повреждения (Vakeeva et al., 2008).

Исследование SkQ1. Эксперименты проводилась по двум схемам. В первой схеме за 5 дней до ишемии проводили исследование базового уровня неврологического статуса животных в батарее поведенческих тестов, далее за 4 дня до моделирования ишемии животным однократно вводили SkQ1 в/б в дозе 1 мкмоль/кг. Во второй схеме за 6 дней до ишемии проводили исследование базового уровня неврологического статуса животных, в последующие 3 суток животным вводили SkQ1 в/б в дозе 0,1 мкмоль/кг ежедневно. Далее для обеих схем на 4-й и 7-й день после ишемии исследовали неврологический дефицит в тесте «Стимулирование конечностей» и только на 7-й день в тесте «Цилиндр». МРТ-исследование головного мозга животных выполняли на 7-е сутки после ишемии.

Результаты морфометрического анализа полученных с МРТ цифровых изображений ишемических очагов показали, что как в первой, так и во второй схеме экспериментов предварительное введение SkQ1 не влияло на объем ишемического повреждения коры головного мозга и стриатума. Исследование животных в тесте «Стимулирования конечностей» на 4-й день выявило тенденцию к восстановлению неврологического дефицита для обеих схем эксперимента, однако к 7-му дню разница между контрольной и экспериментальными группами не была выявлена. Тест «Цилиндр» на 7-й день после индукции ишемии не выявил различий между контрольной группой и группами, получавшими SkQ1 по разным схемам.

Исследование SkQRB. SkQRB вводили в/б за 1 сутки до индукции ишемии в дозах 1 и 2 мкмоль/кг. Через 1 сутки после индукции ишемии крыс подвергали тесту «Стимулирования конечностей» и проводили МРТ-исследование головного мозга.

Результаты морфометрического анализа полученных с помощью МРТ цифровых изображений ишемических очагов показали, что предварительное введение SkQRB не влияло на размер области ишемического повреждения головного мозга. Объем повреждения составил в среднем 307 ± 30 , 317 ± 27 и 317 ± 21 мм³ для групп леченых 2 и 1 мкмоль/кг SkQRB и для контрольной группы, соответственно.

Проверка животных в тесте «Стимулирования конечностей» выявила, что SkQRB только в дозе 1 мкмоль/кг снижал неврологический дефицит. Крысы контрольной группы набирали в тесте $3,7 \pm 0,6$ баллов, а животные, получавшие SkQRB в дозах 2 и 1 мкмоль/кг, имели по $4,8 \pm 1,6$ и $7 \pm 0,9$ ($P < 0,01$) баллов соответственно.

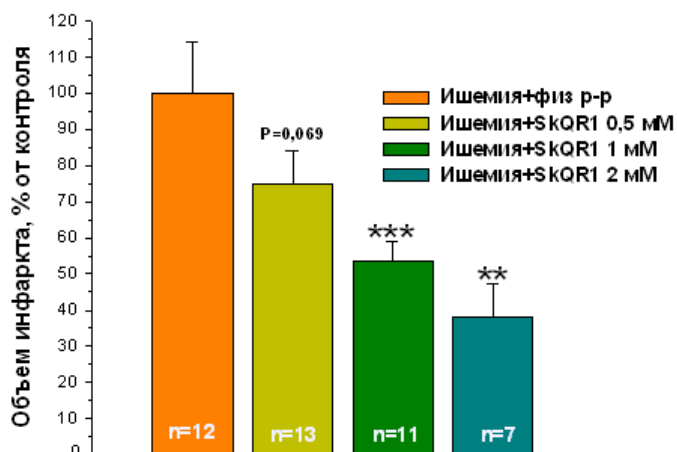


Рис. 5. Влияние в/б введения SkQR1 за 1 сутки до индукции ишемии на объем инфаркта головного мозга (мм^3), который определяли с помощью морфометрического анализа окрашенных TTC срезов через 1 сут. после перекрытия СМА. Количество животных указано в каждом столбике. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (*T-тест*) по сравнению с группой «Ишемия+физ. р-р». Данные представлены в виде: среднее \pm ошибка среднего.

более высокими дозами приводило к статистически значимому снижению ишемической области по усредненным данным на 46% и 65% для доз 1 и 2 мкмоль/кг, соответственно. Количественные результаты, указывающие на уменьшение объема очага у животных, которым инъецировали SkQR1, полностью коррелировали с данными о сенсомоторных нарушениях конечностей этих животных и также имели дозо-зависимый характер. Полученные в тесте «Стимулирования конечностей» данные показали, что внутрибрюшинное введение за 1 сутки до индукции ишемии SkQR1 во всех дозах достоверно уменьшало неврологический дефицит у ишемизированных животных. Если крысы до индукции ишемии набирали в тесте 14 баллов, а ложнооперированные в среднем $13,5 \pm 0,5$ баллов, то после ишемии этот показатель составлял $1,4 \pm 0,2$ балла для ишемической группы, получавшей физиологический раствор вместо тестируемого вещества. Однократное введение препарата позволило статистически значимо улучшить эти показатели до $4,9 \pm 0,7$, $5,5 \pm 0,7$ и $6,5 \pm 1,3$ для доз 0,5, 1 и 2 мкмоль/кг, соответственно (рис. 6).

Исследование SkQR1. SkQR1

вводили в/б за 1 сутки до индукции ишемии в дозах 0,5, 1 и 2 мкмоль/кг. Через 1 сутки после операции крыс подвергали тесту «Стимулирования конечностей» и срезы их мозга окрашивали TTC.

Морфометрический анализ ишемической области по TTC-изображениям показал дозозависимый нейропротекторный эффект SkQR1 (рис. 5). При лечении SkQR1 в дозе 0,5 мкмоль/кг ишемический очаг уменьшался в среднем на 26% ($P = 0,069$). Лечение

Следующим этапом данной работы являлось изучение нейропротекторной активности SkQR1, который вводили интраназально (и/н) после индукции ишемии. Известно, что наиболее предпочтительным способом доставки исследуемого соединения

непосредственно к структурам мозга является интраназальное введение (Vyas et al., 2005).

SkQR1 вводили и/н в дозах 20 нмоль/кг и 1 мкмоль/кг сразу после наступления реперфузии. Через 1 сутки после индукции ишемии крысы подвергали тесту «Стимулирования конечностей» и срезы их мозга окрашивали TTC.

Морфометрический анализ ишемической области по TTC-изображениям выявил, что SkQR1 в дозе 20 нмоль/кг уменьшал объем очага ишемического поражения в среднем на 20%, а в дозе 1 мкмоль/кг – на 36% ($P < 0,01$) по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор (рис. 7).

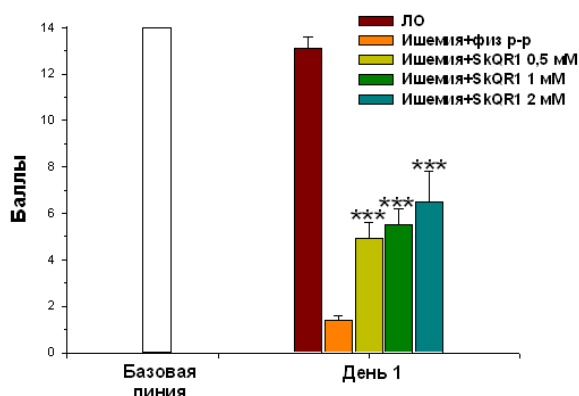


Рис. 6. Влияние в/б введения SkQR1 за 1 сутки до индукции ишемии на снижение неврологического дефицита через 1 сутки после ишемии в тесте «Стимулирования конечностей». Данные представлены в виде: среднее±ошибка среднего. *** $P < 0,001$ (*U-тест* Манна Уитни) по сравнению с группой «Ишемия+физ. р-р».

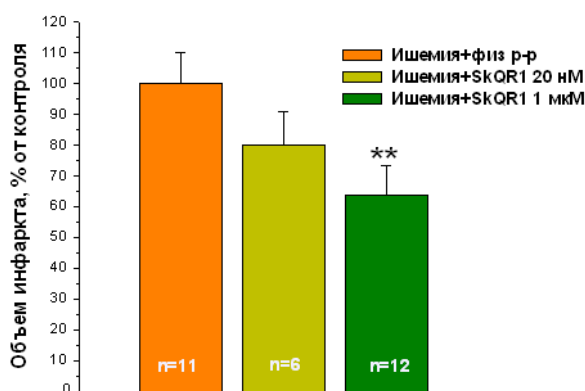


Рис. 7. Влияние и/н инстилляцией SkQR1, произведенной сразу после начала реперфузии, на объем инфаркта головного мозга (мм^3), который определяли с помощью морфометрического анализа окрашенных TTC срезов через 1 сутки после перекрытия СМА. Количество животных указано в каждом столбике. Данные представлены в виде: среднее±ошибка среднего. ** $P < 0,01$ (*T-тест* Манна Уитни) по сравнению с группой «Ишемия+физ. р-р».

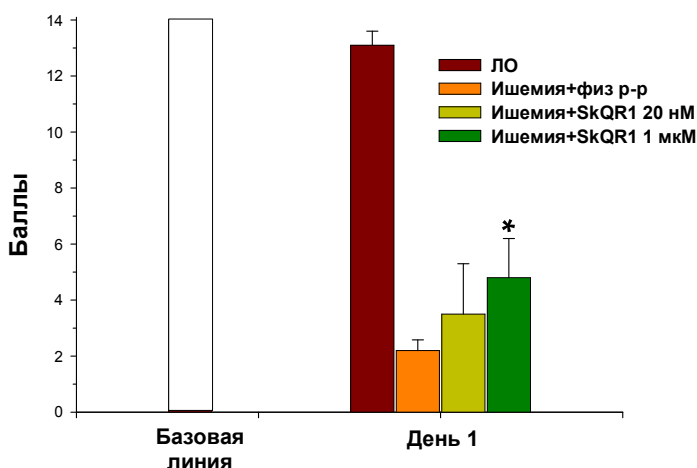


Рис. 8. Влияние и/н инстилляций SkQR1, произведенной сразу после начала реперфузии, на снижение неврологического дефицита через 1 сутки в тесте «Стимулирования конечностей».

Данные в виде: среднее ± ошибка среднего.

* $P < 0,05$ (*U-тест* Манна Уитни) по сравнению с группой «Ишемия+физ. р-р».

баллов до $3,5 \pm 1,8$. Более высокая доза SkQR1 1 мкмоль/кг вызывала статистически значимое снижение неврологического дефицита в 2 раза ($P < 0,05$), что соответствовало набранным $4,8 \pm 1,4$ баллам (рис. 8).

Таким образом, введение SkQR1 до и после индукции фокальной ишемии головного мозга крыс достоверно снижает объем ишемического повреждения и вызывает восстановление неврологического дефицита.

Исследование C12R19. Молекула SkQR1 является сложно устроенной и состоит из двух составных частей: антиоксидантной «головы» и «хвоста», отвечающего за проникновение молекулы в митохондрию. Хотя в системах *in vitro* было показано, что ее антиоксидантная активность напрямую связана с наличием антиоксидантной «головы», мы не исключали, что на более высоком уровне организации живого активность могла проявлять и «хвостовая» часть молекулы. В связи с этим мы изучили возможность нейропротекторного действия препарата C12R19, представляющего собой конъюгат родамина 19 с цепочкой из 12 углеродных атомов, служащим линкером для соединения катионного остатка с антиоксидантной «головой», но не имеющего такой «головы».

Препарат вводили в/б в дозе 1 мкмоль/кг за 1 сутки до индукции ишемии. Морфометрический анализ МР-изображений, полученных через 1 сутки после операции, не выявил различий между объемом инфаркта у крыс, получавших физиологический

Как и в эксперименте с предварительным введением SkQR1 до индукции ишемии, полученные данные по уровню неврологического дефицита при и/н введении SkQR1 сразу после наступления реперфузии коррелировали с данными по уменьшению объема инфарктной зоны. В контрольной группе в тесте «Стимулирования конечностей» животные набирали в среднем $2,2 \pm 0,4$ балла. Введение SkQR1 сразу после реперфузии в дозе 20 нмоль/кг повышало количество полученных

раствор или C12R19. Также не было обнаружено восстановления неврологического дефицита в тесте «Стимулирования конечностей» через 1 сутки после индукции ишемии.

Таким образом, можно заключить, что SkQR1 обладает уникальными свойствами, присущими этой молекуле в комбинации всех ее составных частей.

Изучение молекулярных механизмов нейропротекторного действия SkQR1

Известно, что свободные радикалы принимают участие не только в патологических каскадах, но и обладают сигнальными функциями, которые вовлечены в регулирование выживаемости клеток (Thannickal and Fanburg, 2000). К настоящему времени накоплено значительное количество данных, свидетельствующих о роли активных форм кислорода (АФК), как сигнальных молекул, причем зачастую эти сигналы приводят к протективному и антиапоптотическому эффекту в клетке. В частности, одними из важнейших сигнальных молекул, как в условиях окислительного стресса, так и при АФК-сигнализации, являются эритропоэтин (ЭПО) и киназа гликоген синтазы 3β (GSK- 3β), поскольку эти белки принимают непосредственное участие в регуляции апоптотической гибели клетки. Роль GSK- 3β заключается в регуляции неспецифической проницаемости митохондрий, и последующего апоптоза, причем если GSK- 3β фосфолирирована, то она неактивна и не активирует апоптоз. ЭПО также оказывает противоапоптотическое действие через ряд сигнальных путей (Ghezzi and Brines, 2004).

Очевидно, что митохондриально-направленные антиоксиданты могут изменять редокс-статус клетки и в результате влиять на связанные с АФК сигнальные пути. Действительно, было показано, что SkQR1 влияет на синтез ЭПО и фосфолирирование GSK- 3β в почке (Плотников, 2009). Считается, что почка является основным источником синтеза ЭПО во взрослом организме (Tan et al., 1991), но в мозге также может происходить его синтез (Noguchi et al., 2007). Однако остается неизвестным, насколько важен эритропоэтин, синтезированный в почке, для поддержания пластичности мозга. В ряде исследований было показано, что введение экзогенного эритропоэтина вызывает выраженную нейропротекцию в моделях ишемии головного мозга (Grasso et al., 2007; McPherson and Juul, 2008; McPherson and Juul, 2008). Поэтому, мы решили проверить, как SkQR1 будет влиять на уровень ЭПО и фосфорилированной изоформы GSK- 3β в мозге и сопоставить эти данные с результатами, полученными на почке.

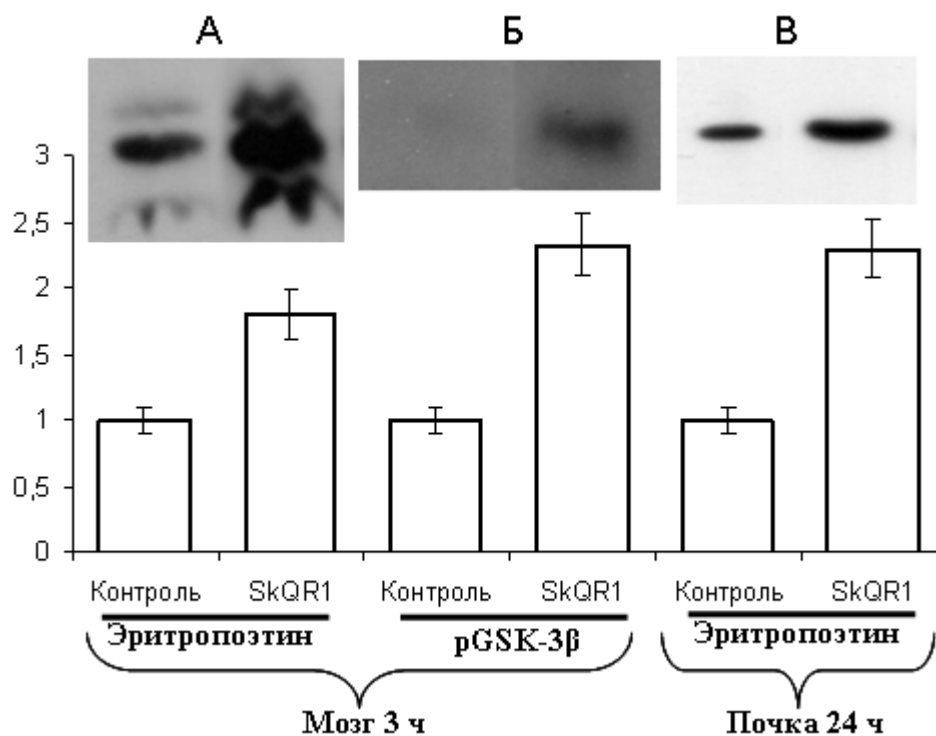


Рис. 9. Репрезентативный иммуноблоттинг гомогенатов почки и мозга с денситометрическим анализом пятен после в/б введения SkQR1 в дозе 1 мкмоль/кг. А – изменения эритропоэтина в мозге через 3ч после введения SkQR1; Б – изменения фосфорилированной формы GSK-3 в мозге через 3ч после введения SkQR1; В – изменения эритропоэтина в почке через 24ч после введения SkQR1.

Для изучения изменения уровня ЭПО в ткани почки SkQR1 в дозе 1 мкмоль/кг вводили внутривенно за 1 сутки. Анализ содержания этого белка, а также pGSK-3β в мозге проводили через 3 ч после введения SkQR1 в дозе 1 мкмоль/кг.

Полученные с помощью иммуноблоттинга данные показали, что в почке через 1 сутки после введения SkQR1 увеличивается содержания ЭПО в 2,2 раза по сравнению с животными, получавшими физиологический раствор. В мозге через 3 ч после введения SkQR1 также происходило увеличение содержания ЭПО в 1,8 и 2,4 раза фосфорилированной формы GSK-3β (Рис. 9).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что нейропротекторное свойство SkQR1, основанное на антиоксидантном действии, может быть усилено за счет увеличения содержания ЭПО в почке и в мозге, а также pGSK-3β в мозге.

ВЫВОДЫ

1. Оработана методика воспроизведения фокального очага ишемического повреждения головного мозга, вызванного перекрытием средней мозговой артерии нитью. Показано, что ишемическое повреждение захватывает область коры, включая сенсомоторную область, а также стриатум и вызывает стойкие нарушения сенсомоторных функций мозга.

2. Изучена динамика формирования ишемического инфаркта с помощью метода магнитно-резонансной томографии на модели фокальной ишемии головного мозга крыс. Очаг ишемического повреждения полностью формировался к 24 ч после индукции ишемии.

3. Введение LiCl в дозе 3 мМ сразу после начала реперфузии уменьшало более чем в 2 раза зону ишемического поражения и способствовало восстановлению неврологических функций.

4. Показано, что введение пептидов PGP и ГК-2 в постишемическом периоде уменьшает объем инфаркта и снижает неврологический дефицит, что свидетельствует о наличии у данных пептидов нейропротекторного эффекта.

5. Митохондриально-адресованный антиоксидант SkQR1 проявляет ярко-выраженный нейропротекторный эффект при введении за 1 сутки до индукции ишемии, а также сразу после начала реперфузии. Показано, что одним из механизмов нейропротекторного действия SkQR1 может быть повышение содержания эритропоэтина и фосфолирированной GSK-3 β в мозге.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Силачев Д.Н.**, Учеваткин А.А., Пирогов Ю.А., Зоров Д.Б., Исаев Н.К. Сравнение магнитно-резонансной томографии и трифенилтетразолиевого выявления повреждений головного мозга как методов исследования экспериментальной фокальной ишемии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2009, Том 147, №2, стр. 232-237.

2. Исаев Н.К., Стельмашук Е.В., Плотников Е.Ю., Хряпенкова Т.Г., Лозиер Е.Р., Долудин Ю.В., **Силачев Д.Н.**, Зоров Д.Б. Роль ацидоза, NMDA-подтипа глутаматных рецепторов и кислоточувствительных ионных каналов (ASIC1a) в развитии нейрональной гибели при ишемии. Биохимия, 2008, №73, стр. 1461-1466.

3. **Silachev D.N.**, Uchevatkin A.A., Doludin Yu.V., Levina S.V., Pirogov Yu.A., Zorov D.B., Isaev N.K. (2008) Use intraluminal suture MCAo model and magnetic resonance imaging

for development of new approaches of diagnostics and treatment of ischemic stroke. International Multidisciplinary Symposium "From experimental biology to preventive and integrative medicine", Sudak, Crimea, Ukraine, p. 119.

4. **Силачев Д.Н.**, Учеваткин А.А., Зоров Д.Б., Левина С., Исаев Н.К. (2008) Сопоставление магнитно-резонансной томографии и трифенилтетразолиевого выявления повреждения головного мозга, как методов исследования ишемического очага. Конференция с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», Санкт-Петербург, Россия, с. 127.

5. **Силачев Д.Н.**, Учеваткин А.А., Исаев Н.К., Зоров Д.Б. (2008) Кратковременная окклюзия средней мозговой артерии крысы как модель оценки нейропротекции с помощью неинвазивных методов. XV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», Москва, Россия, с. 221.

6. **Силачев Д.Н.**, Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф. (2007) Оценка нейропротективной активности фармакологических веществ с использованием модели ишемии/реперфузии головного мозга, вызванной временной окклюзией средней мозговой артерии. III Российский симпозиум "Белки и пептиды", Пущино, Россия, с. 117.

7. **Silachev D.N.**, Shram S.I., Jolkkonen J. (2007) Evaluation of the neuroprotective potential of a long-life product of collagen degradation – peptide Pro-Gly-Pro (PGP). Kuopio Stroke Symposium 2007, Kuopio, Finland, p. 62.