

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-092

Шакова Ф.М.¹, Калинина Т.И.², Гуляев М.В.³, Романова Г.А.¹

Нейропротективный и антиамнестический эффекты комбинированной терапии при ишемическом повреждении префронтальной коры в эксперименте

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

² ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», 117545, г. Москва, Россия, 1-й Дорожный проезд, д. 1

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119192, г. Москва, Россия, Ломоносовский просп., д. 31, к. 5

Цель исследования — изучение влияния комбинированной терапии (мутантные молекулы эритропоэтина (ЕРО) и дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2Н) на воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) и объем поражения коры мозга у крыс с двусторонним ишемическим повреждением префронтальной коры. **Методика.** Мутантные молекулы ЕРО (МЕРО-TR и МЕРО-Fc) с значительно редуцированной эритропоэтической и выраженной цитопротекторной активностью созданы методом геной инженерии. Используемый миметик фактора роста нервов человека, эндогенного регуляторного белка, в экспериментах *in vitro* проявлял отчетливые нейропротективные свойства. Двустороннюю фокальную ишемию префронтальной коры головного мозга крыс создавали методом фотохимического тромбоза. Выработку и оценку УРПИ проводили по стандартной методике. Объем повреждения мозга оценивался при помощи МРТ. МЕРО-TR и МЕРО-Fc (50 мкг/кг) вводили интраназально однократно через 1 ч после фототромбоза, ГК-2Н (1 мг/кг) — внутривенно через 4 ч после фототромбоза и далее в течение 4 послеоперационных суток. **Результаты.** Выявлено статистически значимое сохранение выработанного до ишемии УРПИ, а также значимое снижение объема повреждения коры при комплексной терапии. Полученные данные свидетельствуют об антиамнестическом и нейропротекторном эффектах примененной комбинированной терапии, которые наиболее отчетливо выражены в дозах: МЕРО-Fc (50 мкг/кг) и ГК-2Н (1 мг/кг). **Заключение.** Подтвержден нейропротекторный эффект и усиление антиамнестического эффекта при сочетании применения мутантных производных эритропоэтина — МЕРО-TR и МЕРО-Fc и дипептидного миметика фактора роста нервов человека ГК-2Н.

Ключевые слова: мутантные молекулы эритропоэтина; дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2Н; фототромбоз; кора; нейропротекция; крысы.

Для цитирования: Шакова Ф.М., Калинина Т.И., Гуляев М.В., Романова Г.А. Нейропротективный и антиамнестический эффекты комбинированной терапии при ишемическом повреждении префронтальной коры в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 39—45.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.39-45

Финансирование. Работа поддержана субсидией Президиума РАН по программе «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2014—2017 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность руководителю отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», доктору биол. наук, профессору, член-корреспонденту РАН, Гудашевой Татьяне Александровне за предоставленный для исследования препарат ГК-2Н.

Для корреспонденции: Шакова Фатима Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

Поступила 24.01.2018

Shakova F.M.¹, Kalinina T.I.², Gulyaev M.V.³, Romanova G.A.¹

Neuroprotective and anti-amnestic effects of a combination therapy in a model of photochemical ischemic damage in the prefrontal cortex

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian

² State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, 1st Dorozhnyi Pr. 1, Moscow 117545, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, School of Fundamental Medicine, Lomonosovsky Prospekt 31-5, Moscow 117192, Russia

The aim of this study was to investigate the effect of combination therapy, including mutant erythropoietin molecules (ЕРО) and a dipeptide mimetic of the nerve growth factor, GK-2H, on the conditioned passive avoidance (PA) reflex and

the volume of injury induced by bilateral ischemia of the prefrontal cortex in rats. Using the method of genetic engineering the mutant molecules of EPO, MERO-TR and MERO-Fc, with strongly reduced erythropoietic and pronounced cytoprotective activity were created. The used human nerve growth factor mimetic, an endogenous regulatory protein based on the β -bend of loop 4, which is a dimeric substituted dipeptide of bis- (N-monosuccinyl-glycyl-lysine) hexamethylenediamine, GK-2H human (GK-2H), has proven neuroprotective in *in vitro* experiments. **Methods.** Bilateral focal ischemic infarction was modeled in the rat prefrontal cortex by photochemically induced thrombosis. The PA test was performed according to a standard method. Volume of brain injury was estimated using MRI. MERO-TR, and MERO-Fc (50 μ g/kg, intranasally) were administered once, one hour after the injury. GK-2H (1 mg/kg, i.p.) was injected four hours after the injury and then for next four days. **Results.** The study showed that the complex therapy provided statistically significant retention of the PA reflex developed prior to ischemia and a significant decrease in the volume of injury. The anti-amnestic and neuroprotective effects of combination therapy were most pronounced at doses of MERO-Fc 50 μ g/kg and GK-2H 1 mg/kg. **Conclusion.** This study has confirmed the neuroprotective effect and enhancement of the anti-amnestic effect exerted by the combination of mutant erythropoietin derivatives, MERO-TR and MERO-Fc, and the dipeptide mimetic of human growth factor GK-2H.

Keywords: erythropoietin mutant molecules; dipeptide mimetic of human nerve growth factor, GK-2H; photothrombosis; prefrontal cortex; neuroprotection, rats.

For citation: Shakova F.M., Kalinina T.I., Gulyaev M.V., Romanova G.A. Neuroprotective and anti-amnestic effects of a combination therapy in a model of photochemical ischemic damage in the prefrontal cortex. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 39—45. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.39-45

For correspondence: Fatima M. Shakova, PhD, MD, Leading Researcher, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

Acknowledgments. The work was supported by a grant from the Presidium of the Russian Academy of Sciences in the program «Fundamental Research for the Development of Biomedical Technologies» for 2014—2017.

We thank Prof. Tatyana Alexandrovna Gudasheva, Head of the Department of Chemistry of Medicines from the «Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Zakusov Institute of Pharmacology», for the provided of GK-2H

Received 24.01.2018

Введение

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, инсульт занимает второе место среди причин смертности населения. Вместе с ишемической болезнью сердца, инсульт в 2015 г. унес в общей сложности 15 млн жизней [1]. Ежегодная смертность от инсульта в РФ оценивается как 374 на 100 тыс. населения [2]. При этом в так называемый острый период инсульта, составляющий в среднем 21 сут. с момента его развития, летальность достигает 35%, а в течение года погибает еще 15% из выживших пациентов [3, 4]. Разработка новых схем патогенетической терапии ишемического инсульта позволит снизить летальность и повысить эффективность функционального восстановления пациентов.

Известно, что основными стратегическими направлениями специфической терапии инсульта являются: реперфузия — восстановление мозгового кровотока, профилактика тромбообразования и нейропротекция — поддержание метаболизма и защита ткани мозга от повреждений [5—7]. Использование препаратов нейрометаболического действия повышает устойчивость нейронов в условиях недостаточности кровоснабжения и кислородного голодания. В связи с этим, поиск новых лекарственных препаратов с воз-

можным нейропротективным эффектом остается одной из важнейших задач современной медицины.

Прогресс в определении механизмов нейродегенерации способствует выявлению новых фармакологических мишеней для разработки эффективных средств патогенетической фармакотерапии. Подходы к созданию таких препаратов базируются на современных представлениях о механизмах эндогенного регулирования функций нейронов и их регенерации. Накоплены обширные сведения о цитокинах — молекулах, являющихся посредниками межклеточных взаимодействий, регулирующих кроветворение, иммунный ответ, клеточный цикл в разных тканях, участвующих во многих физиологических и патологических процессах. Один из них — гемопоэтический ростовой фактор эритропоэтин (ЕРО). Помимо регуляции эритропоэза, ЕРО проявляет широкий спектр защитных функций в организме. Особое внимание уделяется изучению производных эритропоэтина, не стимулирующих эритропоэз, но способных инициировать цитопротекцию. Методом генной инженерии созданы мутантные молекулы ЕРО, несущие замену (R103A), как в виде мономера ЕРО-TR, так и димера в форме рекомбинантного белка с Fc-фрагментом иммуноглобулина, сформированного за счёт ди-

меризации двух Fc-фрагментов. Эритропоэтическая активность полученных мутантных гибридных белков оценена в тестах *in vitro*, где производилось исследование способности очищенных мутантных белков инициировать пролиферацию UT-7еро клеток, чувствительных к ЕРО в сравнении со стандартным препаратом ЕРО. Анализ полученных данных показал, что способность взаимодействовать с рецептором и соответственно вызывать пролиферацию UT-7еро клеток, редуцирована в 1000 и более раз у мутанта, содержащего замену R103E в контексте мономера ЕРО. В случае димерных молекул с молекулой Fc, способность вызывать пролиферацию была снижена в 100 раз. Таким образом, созданы мутантные молекулы эритропоэтина в контексте ЕРО-TR и ЕРО-Fc с сильно редуцированной эритропоэтической активностью [8].

Среди известных эндогенных регуляторных белков особое внимание уделяется факторам роста нервной ткани (ФРНТ), в частности, нейротрофинам и среди них — фактору роста нервов (ФРН, *nerve growth factor*, NGF). ФРН участвует в росте, созревании и поддержании жизнедеятельности нейронов в центральной и периферической нервной системе как в норме, так и в патологии [9]. С момента открытия ФРН способность нейротрофинов предотвращать дегенерацию нейронов, стимулировать их регенерацию, повышать синаптическую пластичность, исследованная на различных моделях *in vitro* и *in vivo*, открыла перспективу их использования в качестве основной или вспомогательной терапии при ряде заболеваний, сопровождающихся нейродегенеративными процессами [10]. В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» сконструирован и синтезирован миметик фактора роста нервов человека (*human*) на основе β -изгиба четвертой петли, представляющий собой димерный замещенный дипептид гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина) ГК-2 *human* (ГК-2Н). В экспериментах *in vitro* у соединения выявлены нейропротективные свойства [11—12].

Практически важной задачей является изучение влияния комплексной терапии с использованием мутантных молекул эритропоэтина МЕРО-TR, МЕРО-Fc и дипептидного миметика человеческого фактора роста нервов ГК-2Н на нарушения поведения и объем повреждения при ишемическом фотохимическом тромбозе префронтальной коры головного мозга крыс.

Цель исследования — изучение влияния комбинированной терапии, включающей мутантные молекулы эритропоэтина и дипептидный миметик человеческого фактора роста нервов ГК-2Н на воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания и объем поражения мозга у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры.

Методика

Работа выполнена на 50 нелинейных крысах-самцах массой 200—220 г, выращенных в виварии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии». Животные содержались при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными МЗ РФ №708 от 23.08.2010 г. и одобрены этическим комитетом НИИОПП.

Введение мутантных молекул эритропоэтина — МЕРО-TR и МЕРО-Fc осуществлялось интраназально (и/н) однократно в дозе 50 мкг/кг через 1 ч после воспроизведения фототромбоза префронтальной коры. Дипептидный миметик ГК-2Н вводили внутривентриально (в/в) в дозе 1 мг/кг по схеме: через 4 ч после двустороннего фототромбоза и далее в течение 4-х послеоперационных сут. Все экспериментальные животные были разделены на 5 групп:

1. Фототромбоз + ГК-2Н в дозе 1 мг/кг в/в ($n = 10$);
2. Фототромбоз + МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг и/н + ГК-2Н в дозе 1 мг/кг в/в ($n = 10$);
3. Фототромбоз + МЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг и/н + ГК-2Н в дозе 1 мг/кг в/в по схеме ($n = 10$);
4. Ложнооперированный контроль ($n = 10$);
5. Фототромбоз + 0,9% раствор NaCl в объеме 50 мкл ($n = 10$).

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс — поля Fr1 и Fr2 создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [13—14]. Операцию проводили под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг). После введения фотосенсибилизирующего красителя бенгальского розового («Sigma», USA; 40 мг/кг, внутривенно) крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и удаляли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света — галогеновой лампы мощностью 250 Вт и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа, на 2 мм ростральнее брегмы и на 2 мм латеральнее сагиттального шва и облучали через кости черепа каждое из полушарий мозга холодным светом длиной волны 560 нм в течение 15 минут с каждой стороны. Ложнооперированные животные подвергались тем же манипуляциям, за исключением введения красителя бенгальского розового.

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) вырабатывали по ранее описанной схеме [15]. Определяли латентный период (ЛП) — время, которое проходило от начала тестирования до момента пересече-

чения крысой отверстия, разделяющего освещенный и темный отсеки камеры. В 1-е сут. обучения крысу помещали в освещенный отсек, обследовав который она через некоторое время (ЛП до обучения) переходила в темный отсек, после чего дверь закрывали и оставляли там крысу на 5 мин. Через 1 ч процедуру повторяли, но крысу сразу извлекали из темного отсека. На 2-е сут. эту же процедуру повторяли дважды с интервалом в 1 ч. При повторном заходе крысы в темный отсек камеры дверь в него закрывали и через металлические прутья пола пропускали электрический ток (1,3 мА, 50 Гц, 5 с). УРПИ считали выработанным, если ЛП составлял не менее 300 с. Животных с меньшим ЛП исключали из эксперимента. Оценку ЛП УРПИ проводили на 4-е сут. после фотохимического тромбоза префронтальной коры.

Объем повреждения головного мозга экспериментальных животных оценивали при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) на 4-е сут. после фототромбоза. Животные были предварительно наркотизированы внутривенным введением хлоралгидрата (300 мг/кг). Сканирование головного мозга производилось на магнитно-резонансном томографе BioSpec 70/30 USR фирмы Bruker (Germany) с постоянным магнитным полем 7Тл и с градиентной системой 105мТл/м. Морфометрический анализ МРТ-изображений проводили в программе ImageJ 1.38x (National Institutes of Health, USA) [16].

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Для сравнения показателей латентного периода в тесте УРПИ использовали U-критерий Манна—Уитни для независимых выборок и критерий

Вилкоксона для связанных выборок. Статистическую значимость различий объемов инфаркта оценивали по t-критерию Стьюдента.

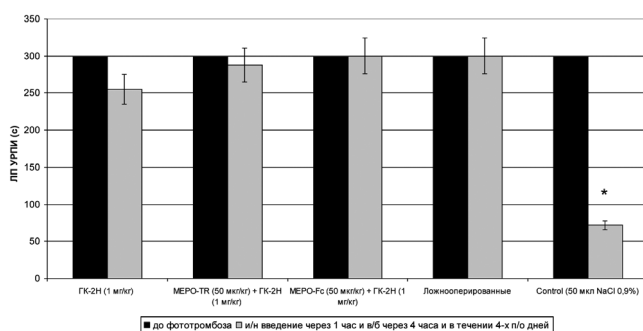
Результаты и обсуждение

В предыдущих работах нами показано, что двусторонний тромбоз кровеносных сосудов префронтальной области коры головного мозга крыс приводит к формированию ишемического очага, который захватывает всю толщу коры и отделен от окружающей неповрежденной ткани четко выраженной границей, такое повреждение коры сопровождается потерей выработанного до ишемии условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [17]. При однократном интраназальном введении мутантных производных эритропоэтина (50 мкг/кг) через 1 ч после операции совместно с внутривенным введением дипептидного миметика ГК-2Н в дозе (1 мг/кг) и далее по схеме, ЛП УРПИ на 4-е сут. после ишемии составил 300 с в группе, получавшей МЕРО-Fc+ГК-2Н, достигнув дооперационного показателя и 288 с в группе с МЕРО-TR+ГК-2Н. ЛП УРПИ животных, получавших ГК-2Н составил 245 с, у контрольной группы с NaCl 0,9% этот показатель составил 68 с (рисунок).

Стоит отметить, что рассчитанный коэффициент эффективности защиты (табл. 1) оказался самым высоким при введении МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг) по схеме и составил 100%, несколько ниже — 94% при введении комплекса МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг) по схеме, что оказалось статистически значимо выше коэффициента защиты при монотерапии мутантными производными эритропоэтина — по 56% для МЕРО-Fc (50 мкг/кг) и МЕРО-TR (50 мкг/кг) [17] соответственно и существенно выше этого показателя у ГК-2Н — 73%.

Полученные данные показали статистически значимое сохранение выработанного до ишемии УРПИ, как при введении ГК-2Н, что было подтверждено ранее [18], так и при комплексной терапии, что свидетельствует о высокой антиамнестической эффективности этих комбинаций.

МРТ-исследование показало (табл. 2), что суммарный объем поражения мозга крысы при фототромбозе составил 29,1 мм³. Во всех трех опытных группах животных, получавших как ГК-2Н, так и МЕРО-TR + ГК-2Н, МЕРО-Fc + ГК-2Н наблюдалось статистически значимое снижение объема повреждения, что соответствовало значениям при монотерапии МЕРО-Fc и МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг, полученным ранее [17] и указывает на



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

По оси абсцисс — группы экспериментальных животных: получавшие ГК-2Н (1 мг/кг), МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг), МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг), ложнооперированные животные, контрольная группа (50 мкл NaCl 0,9%). Темные столбики — показатели группы до фототромбоза, серые — показатели группы после введения веществ на 4-е сут. после фототромбоза. По оси ординат: латентный период условного рефлекса пассивного избегания (ЛП УРПИ, с) соответствующих экспериментальных групп в секундах. * $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим значением ЛП до фототромбоза (Критерий Вилкоксона).

нейропротекторный эффект комбинированной терапии.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженном антиамнестическом, а также нейропротекторном эффектах комбинированной терапии, которые наиболее отчетливо выражены при введении комплекса МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг) по схеме.

Ряд работ свидетельствует об участии ФРН (NGF) в механизме повреждений при инсультах [19—20]. Показано, что острая ишемия головного мозга сопровождается увеличением экспрессии мРНК NGF, содержания нейротрофина в коре, что может быть связано с его защитной функцией от гибели нейронов [21—23]. Была установлена статистически значимая обратная зависимость между размерами сформированного к 5-м — 7-м сут. инфаркта мозга и уровнем NGF в 1-е сут. Эти факты подтверждают участие NGF в компенсаторных механизмах, противодействующих гибели нейронов. Клинические исследования свидетельствуют о том, что NGF эффективен в 1-е сут. после инсульта, т.к. объем инфаркта и выраженность неврологических нарушений зависят от содержания эндогенного NGF именно в этот период [24]. ЕРО и рецептор к нему экспрессируются в центральной и периферической нервной системе, принимая активное участие в эмбриональном развитии человека, а также в защите мозга взрослых от повреждений [25]. При периферическом введении рекомбинантный ЕРО оказывает выраженное протекторное действие на поврежденную церебральную

ткань через активацию антиапоптотических генов, запуская антиоксидантные и противовоспалительные механизмы в нейронах, глиальных и цереброваскулярных эндотелиальных клетках, стимулируя ангио- и нейрогенез [26—28]. Вместе с тем, в связи с малой способностью ЕРО проникать через гематоэнцефалический барьер эти свойства препарата выявляются только в дозах, в 20—100 раз превышающих терапевтические, что часто приводит к развитию нежелательных эффектов со стороны сердечно-сосудистой системы [26].

В наших предыдущих работах было показано, что мутантные формы эритропоэтина, лишенные эритропоэтической активности, как в контексте мономера, так и в контексте димера (МЕРО-TR, МЕРО-Fc), обладают нейропротекторными свойствами даже при уменьшении дозы введения на модели фокальной церебральной ишемии [17]. ГК-2Н также показал нейропротекторное и антиамнестическое действие на модели экспериментальной ишемии [18]. По мнению ряда авторов, одним из механизмов нейропротекторного действия эритропоэтина является активация генов нейротрофинов, а именно BDNF и NGF [29—30]. Помимо этого было показано, что наносомаляная форма рекомбинантного эритропоэтина значительно увеличивает уровень мРНК BDNF и NGF в фронтальной коре и гиппокампе крыс, что подтверждает эту гипотезу [28]. Установлено, что дипептидный миметик фактора роста нервов, обладая нейропротективной активностью, действует по NGF-подобному механизму [10].

Таблица 1

Сравнение антиамнестического действия ГК-2Н, МЕРО-Fc [15], МЕРО-TR [15], МЕРО-Fc+ГК-2Н, МЕРО-TR+ГК-2Н на модели фотохимического ишемического повреждения

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

Примечание. Эффективность рассчитывалась по формуле $A(\%) = 100 * (\text{ЛП (фототромбоз с веществом)} - \text{ЛП (фототромбоз)}) / \text{ЛП (ложнопериованные)} - \text{ЛП (фототромбоз)}$. * — $p < 0,05$ — статистически значимое отличие ЛП контрольной группы с фототромбозом без лечения от ложнопериованных животных; ^ — $p < 0,05$ — статистически значимое отличие от групп, получавших комбинации МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2 (1 мг/кг) и МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2 (1 мг/кг).

Таблица 2

MPT исследование суммарного объема очага ишемического повреждения по экспериментальным группам

Группы животных	0.9% раствор NaCl, 0,5 мл	ГК-2Н (1 мг/кг)	МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг)	МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2 (1 мг/кг)
Суммарный объем (мм ³) повреждения мозга на крысу при интраназальном введении	29,1	21,7*	20,6*	21,5*

Учитывая полученные нами данные по снижению объема повреждения при комбинированной терапии, сопоставимые с результатами при монотерапии каждым из препаратов, можно предположить, что мутантные производные эритропоэтина и дипептидный миметик человеческого фактора роста нервов действуют односторонне, возможно, активируя одни и те же рецепторы. Выраженный антиамнестический эффект, по-видимому, обусловлен стабилизацией баланса между ингибирующей и активирующей нейрональной активностью в структурах, ответственных за память [31].

Заключение

Результаты данного исследования показали нейропротекторный эффект комбинированной терапии и усиление антиамнестического эффекта при сочетанном применении мутантных производных эритропоэтина — МЕРО-TR и МЕРО-Fc и дипептидного миметика человеческого фактора роста нервов ГК-2H. Можно предположить, что комбинированная терапия в период формирования очага ишемического поражения (первые 4 ч), а также в течении 4-х постоперационных сут. интенсивно противодействует гибели нейронов.

References

1. WHO Newsletter. January 2017. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/> (accessed 25 October 2017).
2. Starodubtseva O. S., Begichev S. V. Analysis of the incidence of stroke with the use of information technology. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2012; 8(2): 424-7. (in Russian)
3. Vereshchagin N.V. Varakin Y.Y. Stroke registers in Russia: results and methodological basis of the problem. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova* (prilozhenie «Insul't»). 2001; 1: 34-40. (in Russian)
4. Suslina Z.A., Piradov M.A. *Stroke: diagnosis, treatment, prevention. [Insul't: diagnostika, lechenie, profilaktika]*. Moscow; Medpress-inform; 2008. (in Russian)
5. Piradov M.A., Tanashyan M.M., Domashenko M.A., Sergeev D.V., Maksimova M.Y. Neuroprotection in cerebrovascular diseases: the search for life on Mars or perspective of the direction of the treatment? Part 1. Acute disorders of cerebral circulation. *Annals of neurology*. 2015; 9 (1): 41-50.
6. Maslov L.N., Khaliulin I.G., Podoksenov Yu.K. Neuroprotective and cardioprotective effects of hypothermic preconditioning. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2012; 1: 67-72. (in Russian)
7. Tsygan N.V., Trashkov A.P. Brain functional state and cytoprotective potential in model of acute cerebral hypoxia (experimental research). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2013; 4: 10-6. (in Russian)
8. Kalinina T.I., Cheremnykh A.M., Yurin V.L., Romanov G.A., Shakova F.M. *Neuroprotective effect of carbamoylirovaniem erythropoietin and its derivatives. VIII Moscow international Congress «Biotechnology: state and prospects of development». 17-20 March 2015, Moscow. The book of abstracts. [Neuroprotektivnyy ehffekt karbamilirovannogo ehritropoetina*

i ego proizvodnykh. VIII Moskovskiy mezhdunarodnyy kongress «Biotechnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya»]. 17-20 marta 2015, Moscow. Sbornik tezisev. 114-6. (in Russian)

9. Mannie L. Rocco, L.M., Bianchi P., Soligo M., S.S.P., Aloe L. nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications growth factor. 2013; 31 (4): 115-22.

10. Allen S.J., Dawbarn, Allen D. the Clinical significance of neurotrophins and their receptors. *Wedge. Science*. 2006; 110 (2): 175-91.

11. Gudasheva T.A., Antipova T.A. Seredenin B.S. et al. New low molecular weight mimetics of the nerve growth factor. *Reports of the Academy of Sciences*. 2010; 434 (4): 549-52. (in Russian)

12. Gudasheva, T.A., Tarasiuk A.V., Pomogaibo S.V., Logvinov J.O., Povarnina P.Y., Antipova T.A. Seredenin S.B. Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2012; 38 (3): 280-90. (in Russian)

13. Paxinos G., Watson S. anatomy Atlas of the rat brain. In: the Rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd San Diego, CA. Academic Press; 1997.

14. Watson, D.B., and W.D. Dietrich, R. Busto et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Assessment*. 1985; 17 (5): 497-504.

15. Buresh Y., Bureshova O.J., Houston A.P. *Techniques and basic experiments on the brain and behavior. [Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya]*. Moscow: Higher School; 1991. (in Russian)

16. Silachev D.N., Uchevatkin A.A., Pirogov Y.A., Zorov D.B., Isaev N.K. Comparison of MRI detection of brain damage as the research methods of experimental focal ischemia. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2009; 147 (2): 232-7. (In Russian)

17. Shakova F.M., Kalinina T.I., Gulyaev M.V., Cheremnykh A.M., Jurin V.L., Romanova G.A. Neuroprotective and anti-amnestic effects of mutant erythropoietin molecules on the photochemical model of ischaemic damage in prefrontal cortex of rat brain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2016; 4: 34-8. (in Russian)

18. Seredinin S.B., Gudasheva T.A., Romanova G.A. Neuroprotective and posed anti-amnesic action dipeptides of human mimetic of nerve growth factor GK-2H in experimental ischemic infarction of the cerebral cortex of rats. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2010; 150 (10): 406-9. (in Russian)

19. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Review. Science*. 1987; 237 (4819): 1154-62.

20. Lee T.H., Kato H., Chen S.T., Kogure K., Itoyama Y. Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1998; 29: 1687-96.

21. Guegan C., Ceballos-Picot I., Nicole A., Kato H., Onteniente B., Sola B. Recruitment of several neuroprotective pathways after permanent focal ischemia in mice. *Exp Neuro*. 1998; 154: 371-80.

22. Guegan C., Onteniente B., Makiura Y., Merad-Boudia M., Ceballos-Picot I., Sola B. Reduction of cortical infarction and impairment of apoptosis in NGF-transgenic mice subjected to permanent focal ischemia. *Mol. Brain Res*. 1998; 55: 133-40.

23. Lindvall O., Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Smith M.L., Siesjo B.K. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 648-52.

24. Gusev E.I., Skvortsova V.I. *Cerebral Ischemia. [Ishemiya golovnogo mozga]*. Moscow; Meditsina; 2001. (in Russian)
25. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K. et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke*. 2009; 40 (12): 647-56.
26. Belayev L., Khoutorova L., Zhao W., Vigdorichik A., Belayev A., Busto R. et al. Neuroprotective effect of darbepoetin alfa, a novel recombinant erythropoietic protein, in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2005; 36 (5): 1071-6.
27. Morishita E., Masuda S., Nagao M., et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997; 76 (1): 105-16.
28. Solev I.N., Balabanian V.Y., Volchek I.A., Elizarova O.S., Litvinova S.A., Garibova T.L. Studying the involvement of BDNF and NGF in the mechanism of neuroprotective effect of nanoform of human recombinant erythropoietin. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2013; 155 (2): 210-3.
29. Fumagalli F., Madaschi L., Brenna P., Caino L., Marfia G., Di Giulio A. et al. Single exposure to erythropoietin modulates Nerve Growth Factor expression in the spinal cord following traumatic injury: comparison with methylprednisolone. *Eur J Pharmacol*. 2008; 578(1): 19-27.
30. Villa P., van Beek J., Larsen A.K., Gerwien J., Christensen S., Cerami A. et al. Reduced functional deficits, neuroinflammation and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27: 552-63.
31. Chen H.S., Lipton S.A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem*. 2006; 97: 1611-26.

Сведения об авторах:

Шакова Фатимат Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru (Shakhova F.M.)

Романова Галина Александровна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: romanovaga@mail.ru (Romanova G.A.)

Калинина Татьяна Игоревна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунологии (Kalinina T.Y.)

Гуляев Михаил Викторович, канд. физ.-матем. наук, ст. науч. сотр. факультета фундаментальной медицины, e-mail: tatyana.i.kalinina@googlemail.com, mihon-epsilon@yandex.ru (Gulyaev M.V.)