Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт общей и экспериментальной биологии»
Сибирское отделение Российской академии наук

На правах рукописи

Хлёсткина Мария Сергеевна

ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТИКОЛИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Г.З. Суфианова

Улан-Удэ – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 12
1.1.Общие представления о механизмах ишемического повреждения головного мозга. 12
1.2.Физиологическая роль, нейропротективная активность и потенциальные механизмы действия цитиколина 17
1.2.1.Некоторые аспекты фармакокинетики и терапевтический потенциал цитиколина 17
1.2.2.Физиологическая роль и терапевтическая значимость пиримидиновых рецепторов в ЦНС 22
1.2.3.Исследования нейропротективного действия цитиколина при церебральной гипоксии и ишемии в эксперименте 26
1.2.4.Клинические исследования эффективности цитиколина при ишемическом повреждении ЦНС 30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 33
2.1.Объекты исследования и используемые препараты 33
2.2.Моделирование ишемии головного мозга 37
2.3.Общебиологические, неврологические и физиологические методы исследования в эксперименте 43
2.4. Методы статистической обработки результатов 51
ГЛАВА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО И ЛЕЧЕБНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТИКОЛИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ФОКАЛЬНОЙ ТРАНЗИТОРНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА 52
3.1.Неврологические нарушения при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс на фоне введения цитиколина 52
3.2.Гистопатологические нарушения при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс на фоне введения цитиколина 61

3.3.Концентрация нейроспецифических белков NSE и S100b в плазме крови при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс на фоне введения цитиколина 67
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТИКОЛИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЛОБАЛЬНОЙ СТРАНГУЛЯЦИОННОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У МЫШЕЙ.... 73
4.1.Изменения продолжительности гаспинга, локального мозгового кровотока, уровня постоянного потенциала и электроэнцефалограммы при моделировании глобальной ишемии головного мозга у мышей..... 73
4.2.Сравнительная оценка нейропротективного эффекта цитиколина при введении за 30 и 60 минут до моделирования глобальной ишемии головного мозга у мышей 81
4.3.Влияние селективного антагониста P2Y6 рецепторов MRS2578 на продолжительность гаспинга и электрофизиологические нарушения при моделировании глобальной ишемии головного мозга на фоне профилактического применения цитиколина 85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 88
ВЫВОДЫ 94
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... 95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... 122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Инсульт является второй ведущей причиной смертности и инвалидизации во всем мире (Котов С.В. и соавт., 2013; Санду Е.А. и соавт., 2016; Antonenko K. et al., 2016; O'Donnell M.J. et al., 2016; Thrift A.G. et al., 2017; Фирсов К.В. и соавт., 2019) и основной причиной заболеваемости населения, особенно в наиболее трудоспособном среднем и пожилом возрасте (Котов С.В. и соавт., 2013; Санду Е.А. и соавт., 2016; O'Donnell M.J. et al., 2016; Antonenko K. et al., 2016; Thrift A.G. et al., 2017). В результате демографических, популяционных и экологических процессов, в частности увеличения общей продолжительности жизни населения, изменения характера питания, ожирения и множества других причин, актуальность диагностики и лечения инсульта неизбежно будет увеличиваться (O'Donnell M.J. et al., 2016; Antonenko K. et al., 2016). Фактором, повышающим важность исследований, посвященных разработке и адаптации методов лечения первичных и вторичных ишемических повреждений ЦНС, является также высокая частота данных нарушений в результате оперативных вмешательств на головном и спинном мозге, которые ухудшают прогноз и реабилитационный потенциал нейрохирургических пациентов (Суфианова Г.З., 2003, 2014; Ricarte I.F. et al., 2015; Badenes R. et al., 2015; Stoner K.E. et al., 2016; Kashkoush A.I. et al., 2017; Udesh R. et al., 2017; Hood R. et al., 2018; Gopalakrishnan M.S. et al., 2018; Raffa G.M. et al., 2019; Литвиненко И.В. и соавт., 2019).

Исследования последних десятилетий показали, что только основательное изучение ишемических метаболических каскадов и ответных характерных реакций мозговой ткани на повреждение, которые ведут к неизбежной модификации области обратимых биохимических изменений в прочный морфологический дефект, может определить дальнейшую направленность патогенетической терапии церебрального ишемического инсульта (Домашенко М.А. и соавт., 2014; Суфианова Г.З. и соавт., 2014; Marin

M.A., Carmichael S.T., 2018; Tehse J., Taghibiglou C., 2018; Gimenez C. et al., 2018; Tang K.S., Tan J.S., 2019; Albrecht M. et al., 2019). Основной современный подход к фармакологической коррекции патобиохимических нарушений при повреждении нервной ткани – применение лекарственных средств с плейотропным действием, включающем нейрорепаративный и нейропротективный эффекты и модулирование нейропластичности (Candelario-Jalil E., 2009; Cansev M. et al., 2008; Morton C.C. et al., 2013; Суфианова Г.З., 2003, 2014; Badenes R. et al., 2015; Gimenez C. et al., 2018; Tang K.S., Tan J.S., 2019; Albrecht M. et al., 2019). Таргетным воздействием на ключевые звенья процессов повреждения нервной ткани гипоксического, ишемического, травматического или другого генеза обладает препарат из группы нейропротекторов – цитиколин (цитидин-5-дифосфохолин, ЦДФ-холин) – естественный эндогенный мононуклеотид, идентичный фосфатидилхолину и состоящий из холина, пирофосфата и цитидина (Grieb P., 2014; Secades J.J., 2016; El Sayed I., 2018).

Степень разработанности темы

В настоящее время, в многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях показан выраженный нейропротективный и нейрорепаративный потенциал цитиколина (Cotroneo A.M. et al., 2013; Мушба А.В. и соавт., 2016). В клинической практике, согласно проведенным метаанализам, цитиколин является препаратом выбора для лечения цереброваскулярных заболеваний (Hamurtekin E., 2007; Secades J.J., 2016), особенно в хронической форме, поскольку его клиническое применение оправдано фармакологическими эффектами, которые он оказывает на центральную нервную систему. Несмотря на то, что в немногочисленных экспериментальных исследованиях показан профилактический нейропротективный эффект данного препарата (Tornos M.E. et al., 1983; Krupinski J. et al., 2002; Hurtado O. et al., 2005; Giralt D. et al., 2010), работ,

посвященных изучению профилактического назначения цитиколина в клинической практике нет. Также, до настоящего времени не проводилось сравнительных исследований защитного действия цитиколина при ишемии головного мозга на фоне его профилактического и лечебного применения. Не изучено влияние цитиколина на динамику развития ишемической деполяризации – одного из ключевых звеньев повреждения нервной ткани (Lauritzen M., Strong A.J., 2017).

Точный механизм защитного действия цитиколина остается неизвестным (Grieb P., 2014; Secades J.J., 2016). Ранее было продемонстрировано, что лечение цитиколином в постишемическом периоде приводит к функциональному и морфологическому восстановлению клеток мозга за счет его влияния на синтез фосфолипидов и участия холина в нейрохимических процессах (Plataras C. et al., 2000; Li Z., Vance D.E., 2006; Grieb P., 2014; Secades J.J., 2016). Ключевой особенностью фармакокинетики цитиколина является то, что при его экзогенном поступлении, он под действием цитидин-дезаминазы в плазме достаточно быстро метаболизируется до уридина (Страдомский Б.В., 1992; Wurtman R.J., et al., 2000; Cansev M., 2006; Cansev M., 2006; Dobolyi A. et al., 2011; Löffler M. et al., 2018), поэтому можно предположить, что часть его эффектов связана с повышением в головном мозге концентрации уридина и стимуляцией специфических пиримидиновых рецепторов, в частности P2Y6 (Koyuncuoglu T. et al., 2015; Rafehi M, Müller C.E., 2018; Löffler M. et al., 2018). Однако потенциальные рецепторные механизмы действия цитиколина остаются неизвестными, так как его защитный эффект, особенно при профилактическом назначении, нельзя однозначно объяснить влиянием на биосинтез фосфолипидов (Grieb P., 2014; Secades J.J., 2016; El Sayed I., 2018).

Цель исследования

Выявить особенности нейропротективного действия цитиколина при глобальной и фокальной ишемии головного мозга у лабораторных животных и определить потенциальные рецепторные механизмы действия данного препарата.

Задачи исследования

1. Оценить нейропротективное действие цитиколина по изменению неврологического статуса, концентрации нейроспецифических белков в сыворотке крови и гистопатологическим нарушениям при транзиторной фокальной ишемии головного мозга у белых крыс.
2. Изучить нейропротективное действие цитиколина при введении в разные временные интервалы до моделирования глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у белых мышей по данным регистрации спонтанной биоэлектрической активности головного мозга и продолжительности гаспинга.
3. Исследовать влияние селективного антагониста P2Y6 рецепторов MRS2578 на продолжительность гаспинга, изменения локального мозгового кровотока и электрофизиологические нарушения при моделировании глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у белых мышей.
4. Выявить потенциальную роль P2Y6 рецепторов в механизмах нейропротективного действия цитиколина.

Научная новизна работы

На модели фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс показано, что превентивное введение цитиколина экспериментальным животным в дозе 2000 мг/кг за 60 минут до воспроизведения ишемии, в сравнение с его ежедневным введением после ишемии, приводит к меньшим неврологическим нарушениям, предотвращает повышение концентрации нейроспецифических белков NSE и S100b в плазме крови и предупреждает

развитие органических изменений в головном мозге у лабораторных животных.

На модели глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей впервые показано, что одномоментная регистрация уровня постоянного потенциала и электроэнцефалограммы, отражающих динамические процессы ишемической деполяризации, позволяет объективизировать повреждение нервной ткани путем определения скорости альтерации спонтанной биоэлектрической активности (максимальная депрессия суммарной амплитуды ЭЭГ и негативизация УПП), а также времени появления и окончания гаспинга по дыхательным артефактам; установлена прямая связь между выраженностью электрофизиологических нарушений и продолжительностью гаспинга у мышей. Установлено, что введение цитиколина в экспериментальной эффективной дозе 2000 мг/кг за 60 минут до моделирования глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей сопровождается удлинением продолжительности гаспинга и времени развития максимальных электрофизиологических нарушений. Введение цитиколина в указанной дозе за 30 минут до воспроизведения ишемии не сопровождается значимыми проявлениями его нейропротективного действия.

Впервые в эксперименте, на модели глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей установлено, что выраженное нейропротективное влияние цитиколина за 60 минут до ишемии блокируется селективным антагонистом пиримидиновых рецепторов MRS2578, что предполагает роль P2Y6 рецепторов как потенциальную мишень ведущего фармакологического эффекта цитиколина. При этом показано отсутствие значимого влияния селективного антагониста P2Y6 рецепторов MRS2578 на продолжительность гаспинга и динамику спонтанной биоэлектрической активности головного мозга.

Указанные особенности в нейропротективном действии цитиколина имеют важное значение для клинической медицины.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе выполнения диссертационного исследования были разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение научной проблемы, имеющей важное значение для развития фармакологии, клинической фармакологии. По-новому оценено значение цитиколина как перспективного профилактического препарата при ишемии головного мозга. Обосновано продолжение целенаправленного поиска рецепторных мишеней нейропротективной активности данного препарата.

Разработана и предложена новая малотравматичная модель фокальной транзиторной ишемии головного мозга, которая позволяет проводить изучение нейропротективных свойств лекарственных препаратов. Способ воспроизведения фокальной ишемии головного мозга защищен патентом РФ: RU2639787C1.

Методология и методы исследования

Исследования проведены в период с 2015 по 2019 г. Эксперименты выполняли на 51 здоровых беспородных крысах-самцах, массой 220-250 г. и 83 белых беспородных мышах-самцах, массой 20-25 г. Для оценки нейропротективного действия цитиколина при фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс использовали неврологические шкалы, определяли концентрацию нейроспецифических белков плазмы крови (NSE, S100β) и гистопатологические изменения; на модели глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей оценивали продолжительность гаспинга, регистрировали спонтанную биоэлектрическую активность (УПП и ЭЭГ) и локальный мозговой кровоток. Все эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН. Дизайн исследования согласуется с приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 N 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Моделирование ишемии головного мозга, вживление электродов, а также другие инвазивные процедуры

проводили под адекватным обезболиванием (золетил-100, 7,5 мг/кг, внутрибрюшинно). Цитиколин (2000 мг/кг - экспериментальная эффективная доза) во всех экспериментальных группах вводили внутрибрюшинно. Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных специалистов по данной проблеме, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту

1. Цитиколин обладает выраженным нейропротективным действием при профилактическом введении животным при фокальной и глобальной ишемии головного мозга.
2. Выраженный нейропротективный эффект цитиколина проявляется при его введении за 60 минут до моделирования глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей.
3. Пиримидиновые P2Y6 рецепторы являются потенциальной мишенью нейропротективного эффекта цитиколина.

Внедрение результатов исследования в практику

Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедре нейрохирургии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедре фармакологии, клинической фармакологии и фитотерапии медицинского института ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова», в работе ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН и внедрены в лечебную работу ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментального материала, однородностью выборки субъектов, применением современных методов исследования и адекватных методов биомедицинской статистики, теоретическим обоснованием полученных данных. Материалы и основные положения диссертации представлялись на конгрессе «Человек и лекарство. УРАЛ-2016» (г. Тюмень, 2016), XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2017), на конкурсе молодых ученых по специальности «Клиническая фармакология» в рамках съезда молодых терапевтов XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (г. Москва, 2017 г.), региональной научно-практической конференции молодых инноваторов «Новые векторы развития науки и техники в Тюменской области» в формате всероссийского конкурса инноваций «УМНИК» (г. Тюмень, 2017, 2018), V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (г. Ярославль, 2018), XIII национальном конгрессе терапевтов (г. Москва, 2018), XXV российском национальном конгрессе «Человек и Лекарство» (г. Москва, 2018). Общероссийском научно-практическом мероприятии «Эстафета вузовской науки» (диплом II степени, г. Москва, 2019).

Личное участие автора

Автором проведена самостоятельная работа с источниками отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, обобщение данных, оформление в виде обзора литературы, освоение методик и выполнение экспериментов на животных, в частности, моделирование ишемии головного мозга у крыс и мышей, регистрация и анализ электрофизиологических параметров у экспериментальных животных, проведение биохимических анализов, а также морфологическое исследование головного мозга животных в соответствии с дизайном исследований. Автором осуществлялось: формирование базы данных, статистическая обработка

полученного материала, написание и публикация статей, участие в научно-практических конференциях и конгрессах.

Публикации

По материалам выполненных исследований опубликовано 15 работ, в том числе 4 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертации. Получен патент на изобретение (RU2639787C1, от 22.12.2017 Бюл. № 36).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты фармакологических исследований, заключение, выводы и список литературы. Работа иллюстрирована 34 рисунками и 8 таблицами. Список литературы содержит 224 источника, из них 22 отечественных и 202 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие представления о механизмах ишемического повреждения головного мозга.

Ишемия нервной ткани представляет собой динамический и потенциально обратимый процесс, включающий совокупность сложных гемодинамических и метаболических изменений, происходящих при недостаточности кровоснабжения головного мозга (Виленский Б.С., 2008) и приводящих к дисфункции и гибели нервных клеток (Гусев Е.И. и соавт., 2003; Суфианова Г.З., Шапкин А.Г., 2014). Чаще всего в 45% случаев ишемические инсульты вызваны тромбозом артерий, 20% имеют тромбоэмболическое происхождение (Hinkle J. L., Guanci M. M., 2007) приводящее к развитию фокальной ишемии. Глобальная ишемия формируется в результате тотального нарушения кровообращения по магистральным сосудистым бассейнам головного мозга, как правило при острой сердечной недостаточности или клинической смерти (Pearce A. et al., 2017). От длительности и степени снижения мозгового кровоснабжения зависят последствия и выраженность повреждения нервной ткани. В первую очередь при развитии ишемии происходит гибель наиболее чувствительных нейронов коры головного мозга, CA1 области гиппокампа и клеток Пуркинье в мозжечке (Campbell B.C.V. et al., 2019). В ответ на снижение мозгового кровотока в первые несколько секунд/минут запускается характерный специфический ишемический каскад (Dirnagi U. et al., 1999).

Резкое ограничение поступления кислорода и метаболических субстратов к нейронам первоначально вызывает дефицит и истощение запасов АТФ (Fedorova T.N. et al., 2018). Развивается ионный дисбаланс, происходит высвобождение глутамата в межклеточное пространство, что в итоге приводит к развитию механизмов эксайтотоксичности (Chamorro Á. et al., 2016). Резкое увеличение уровня внутриклеточного кальция вызывает митохондриальную дисфункцию и запускает оксидативный и нитрозативный стресс; при этом,

продолжающееся увеличение концентрации ионов кальция внутри клеток инициирует пост-ишемическое воспаление, которое в конечном итоге приводит к распаду клеточных мембран, гибели нейронов, глии и эндотелиальных клеток в очаге инсульта (Stankowski J. N., Gupta R., 2011; Stoll G. et al., 2018). Выделяют три критических уровня снижения кровотока. Первый критический уровень возникает при снижении кровотока до 70% от исходного (меньше 50 мл/100гр/мин). Происходит нарушение работы рибосом, тормозится синтез белка (Heiss W.D., 2012). Второй критический уровень начинается при снижении кровотока до 50% от исходного (меньше 35 мл/100гр/мин). Активируется анаэробный гликолиз, развивается цитотоксический отек и лактат-ацидоз. Усугубление ишемии на фоне снижения локального мозгового кровотока до 20 мл/100гр/мин (третий критический уровень) приводит к дефициту АТФ, нарушению работы ионных каналов и дисбалансу между тормозными и возбуждающими нейромедиаторами (Obrenovitch T.P., 1995; Erecinska M., Silver I.A., 2001; Zauner A. et al., 2002). При данном уровне кровоснабжения головного мозга развивается аноксическая деполяризация мембран нейронов и необратимое повреждение клеток.

В области ишемического повреждения нервной ткани выделяют две зоны, характеризующиеся различной степенью нарушения кровоснабжения. Область с максимальным нарушением локального мозгового кровотока формирует ядро ишемии. Эта область в течение 3-6 часов остается окруженной ишемизированной, но способной к восстановлению зоной полутени или пенумбры (Гусев Е.И., 2008). Для области пенумбры первоначально характерны преимущественно функциональные изменения, не приводящие к структурным дефектам (Wu L., et al., 2018; Rudkin S., et al., 2018). В области ишемической полутени, окружающей ядро инфаркта, ткань сохраняет жизнеспособность в течение определенного промежутка времени в зависимости от того, как происходит процесс восстановления кровотока (Stoll G. et al., 2018). В первую очередь в области ядра ишемии и пенумбры гибнут

более уязвимые нейроны и олигодендроциты, чем, к примеру, астроглиальные или эндотелиальные клетки (Lo E.H. et al., 2003), поэтому длительность существования зоны пенумбры определяет границы терапевтического окна. Некоторые исследователи дополнительно выделяют периинфарктную область, т.н. экстрапенумбру, располагающуюся вокруг области ишемической полутени и характеризующуюся мозговым кровотоком, близким к нормальным показателям, а также преимущественно функциональными нарушениями (Heiss W.D., Graf R., 1994; Lipton P., 1999; Davis S. et al., 2014).

С момента возникновения острой ишемии, возникает гипоксия и резкое снижение поступления основного субстрата энергетического метаболизма - глюкозы. Это приводит к нарушению окислительного фосфорилирования в митохондриях (Lo E.H. et al., 2003; Mass M. B., 2009). Прогрессирующее снижение АТФ индуцирует гликолиз, что сопровождается накоплением H+ и лактата, которые запускают внутриклеточное окисление и дополнительно увеличивают дефицит макроэргов (Lo E.H. et al., 2003). При критическом снижении уровня АТФ прекращает функционировать Na+/ K+-АТФаза (Mass M. B., 2009), что приводит к грубому нарушению ионного гомеостаза и деполяризации нейронов и астроцитов (Суфианова Г.З., Шапкин А.Г., 2014). Неконтролируемая деполяризация мембраны, и аномальные изменения концентрации градиентов Na+ и K+ вызывают избыточное высвобождение глутамата и других нейромедиаторов во внеклеточное пространство и замедления обратного поступления этих же веществ внутрь клетки (Mitchinson M.J., 1980; Dirnagi U. et al., 1999). Аноксическая или ишемическая деполяризация при повреждении является достаточно универсальным патофизиологическим механизмом повреждения нервной ткани (Hossmann K.A., 1994; Hossmann K.A., 1996; Kaminogo M. et al., 1999; Суфианова Г.З., 2003; Суфианова Г.З., Шапкин А.Г., 2014). Повреждающее действие деполяризации, которая является прямым следствием нарушения ионного гомеостаза проявляется только при наличии метаболических нарушений, связанных с нарушением микроциркуляции. Распространяющаяся депрессия,

сходная по своим электрофизиологическим и биохимическим проявлениям с ишемической деполяризацией, повреждение нервных клеток не вызывает (Nedergaard M., Hansen A.J., 1993; Back T. et al., 1996; Hossmann K.A., 2003).

Высокая экстрацеллюлярная концентрация глутамата и активация глутаматных NMDA рецепторов запускает каскад эксайтотоксичности (Mitchinson M.J., 1980), буферизации кальция, митохондриальной дисфункции и образованию свободных радикалов (Waring W.S. et al. 2002; Pham-Huy L. A., et al., 2008;Ciancarelli I. et al., 2013). Все эти механизмы, действующие синергично, приводят к апоптозу нервных клеток и формированию инфаркта (Crow M. T. et al., 2004; Favaloro B. et al., 2012). Активация N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторов глутамата является триггерным фактором этого процесса (Elmore S., 2007). NMDA рецепторы (NMDA-R) взаимодействуют с множественными внутриклеточными белками, в основном за счет субъединиц NR1 и NR2 (Marler J., 1995; Sobolewski P.et al., 2014). Эксайтотоксичность запускается при избирательной активации преимущественно внесинаптических NMDA-R, содержащих NR2B субъединицу (Shichita T. et al., 2012; Liu H. et al., 2015). Связь NMDA-R с внутриклеточными белками и сигнальными ферментами, осуществляется с помощью белкового компонента PDZ при взаимодействии с субъединицей NMDA-NR2B (Marler J., 1995), в частности NMDA-R связан с NO-синтазой (nNOS) (Millan M., 2010). Активация этого фермента приводит к повышению синтеза оксида азота (NO) (Parihar L. et al., 2014), который является субстратом, повышающим реакционную способность свободных радикалов, таких как пероксинитриты (Muir K. W., 2001; Wardlaw J. M. et al. 2012; Zhou Zhong-He. et al., 2014). Дополнительно увеличение внутриклеточного Ca2+ до 50-100 мкМ сопровождается неизбежной активацией протеаз, липаз, фосфатаз и эндонуклеаз (Chen H. S., 2006). Митохондриальная дисфункция является результатом окислительно-нитрозативного стресса и прямого токсического воздействия повышенной концентрации внутриклеточного Ca2+. В результате увеличивается производство свободных радикалов, нарушается

антиоксидантная защита (Paul A. et al., 2010; Mitta M. et al., 2012), и индуцируется апоптоз (Yamaguchi T., 1998; Han B. H. et al., 2000). Появляются активные формы кислорода (ROS) и активные формы азота (RNS) (Paul A. et al., 2010). ROS и RNS могут непосредственно окисляться и повреждать макромолекулы, такие как ДНК, белки и липиды (Namura S., et al., 1998; Nicotera P. et al., 2000; Shirley R. et al., 2014). Нейроны особенно уязвимы к окислительному стрессу вследствие их высокой метаболической активности и потребления кислорода. Кроме того, ROS и RNS могут также косвенно способствовать повреждению тканей путем активации ряда клеточных реакций, приводящих к экспрессии стресс-чувствительных генов и белков (Chen H. et al., 2011). Параллельно посредством кальций-зависимых процессов происходит активация фосфолипазы А2 и запускается процесс синтеза арахидоновой кислоты из фосфолипидов, которые далее метаболизируются под действием циклооксигеназы (ЦОГ) в эйкозаноиды совместно с образованием свободных радикалов. Кроме того, активация фосфолипазы А2 генерирует лизофосфатиды, изменяющие мембранные структуры (Zandieh A. et al., 2013). Все эти факторы в итоге приводят к активации каспаз и апоптозу (Yamaguchi T., 1998). Программируемая гибель клеток запускается после часа от момента начала ишемии и длится в течение нескольких дней (Yamaguchi T., 1998). Этот период является еще одним ключевым временным окном для терапевтического воздействия (Yamaguchi T., 1998).

Таким образом, ишемия нервной ткани является сложным патологическим процессом сопровождающимся нарушением ионного и энергетического гомеостаза, эксайтотоксичностью и включающий каскад реакций, приводящий к формированию области инфаркта головного мозга.

1.2. Физиологическая роль, нейропротективная активность и потенциальные механизмы действия цитиколина

1.2.1. Некоторые аспекты фармакокинетики и терапевтический потенциал цитиколина

Цитиколин (цитидин-5-дифосфохолин, ЦДФ-холин) – естественный эндогенный мононуклеотид, идентичный фосфатидилхолину и состоящий из холина, пирофосфата и цитидина, нуклеозида, образованного соединением рибозного кольца и цитозина (Grieb P., 2014). Химическая структура цитиколина представлена на рис. 1.1.

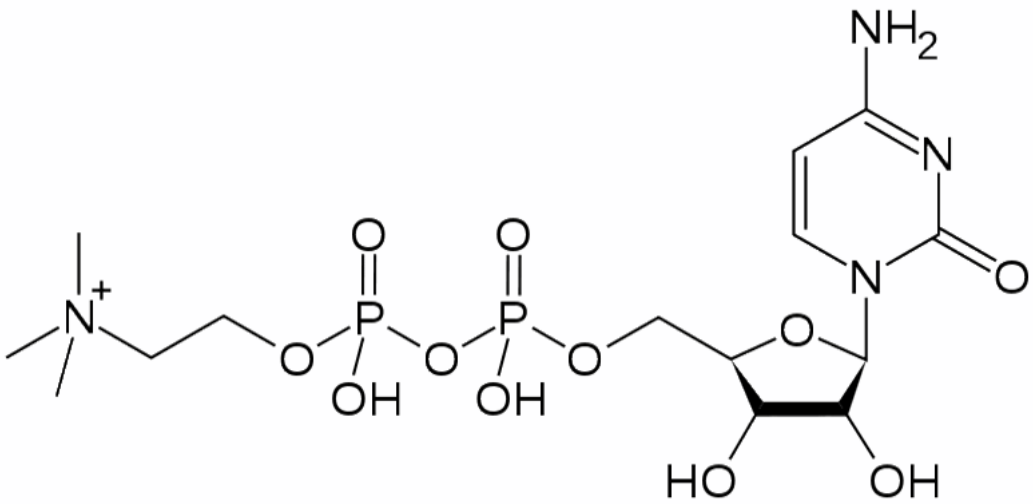


Рис. 1.1. *Химическая структура цитидин-5-дифосфохолина*

Цитидин-5-дифосфохолин изначально был выделен Kennedy E.P. и коллегами в 1955 г. и синтезирован в 1956 г. (Kennedy E.P., 1956; Grieb P., 2014). Данный препарат с тех пор успешно исследуется как перспективное лекарственное средство для терапии заболеваний нервной системы, в том числе и ишемического генеза (Kennedy E.P., Weiss S.B.,1956; Zaleska M.M. et al., 2009; Grieb P., 2014). В организме ЦДФ-холин образуется из цитидин-5′-трифосфата (ЦТФ) и холинфосфата в результате обратимой реакции, катализируемой холинфосфат-цитидилтрансферазой (Li Z., et al., 2008).

Впоследствии ЦДФ-холин соединяется с диацилглицерином, образуя фосфатидилхолин, который участвует в трех важных путях метаболизма: синтезе фосфолипидов через фосфорилхолин, синтезе ацетилхолина и окислении до бетаина, который служит донатором метиловых групп (Kennedy E.P., Weiss S.B., 1956; Шавловская О. А., 2012). Экзогенный цитиколин, не зависимо от пути введения, вне ЦНС превращается в два основных циркулирующих метаболита - цитидин и холин. Ключевой особенностью фармакокинетики цитиколина является то, что при его экзогенном поступлении он под действием цитидин-дезаминазы в плазме достаточно быстро метаболизируется до уридина. Этот процесс имеет определённые видовые особенности, в частности он активен у человека и песчанок, в результате чего уридин плазмы является преобладающим метаболитом цитиколина, в то время как у крыс концентрация цитидина в плазме остается высокой (Wurtman R.J. et al., 2009).

В тканях головного мозга пиримидины практически не синтезируются (Bourget P. A., Tremblay, G. C., 1972), поэтому большая часть пиримидиновых оснований в мозге обеспечивается за счет транспорта пиримидиновых нуклеозидов, в частности уридина, из плазмы (Cornford E. M., Oldendorf W. H., 1975; Geiger A. et al., 2009). Циркулирующие в плазме крови цитидин и уридин транспортируются через гематоэнцефалический барьер с помощью натрий-зависимых транспортеров- CNT1-3 (Cansev M., 2006; Rose J. B., Coe I. R., 2008; King A. E. et al., 2009), при этом наибольшее сродство к ним обнаружено именно у CNT-2 (Zhang J. et al., 2005).

Поскольку сродство CNT2 к уридину гораздо выше, чем к цитидину (Ritzel M. W. et al., 2005), основной пиримидин в мозге является именно уридин даже у крыс, что было экспериментально подтверждено (Traut T.W., 1994). Согласно проведенным исследованиям, экзогенные фракции цитидина и уридина максимально накапливаются в ткани головного мозга в химически свободной форме в среднем через 60 минут после парентерального введения (Страдомский Б.В., 1992; Secades J.J., 2016).

Нейроны и глиальные клетки также принимают уридин из внеклеточного пространства через нуклеозид - транспортеры (Guillen-Gomez E. et al., 2004; Nagai K. et al., 2005). В головном мозге происходит повторный ресинтез цитидин-5-дифосфохолина при участии фермента холинфосфат-цитидилтрансферазы: уридин трансформируется в уридин-5-трифосфат (УТФ), а затем в цитидин-5-трифосфат (ЦТФ). Последние, кроме того, необходимы для образования РНК и ДНК (Genchev D. D. et al., 1974; Lecca D., Ceruti S., 2008).

Учитывая, что концентрация уридина в ЦНС превалирует над другими пиримидиновыми основаниями (Traut T. W., 1994), предполагается, что цитиколин, кроме непосредственного участия в метаболизме фосфолипидов, является пролекарстовом, т.е. часть его эффектов связана с повышением в головном мозге концентрации уридина и стимуляцией специфических пиримидиновых рецепторов (Sonoda T., Tatibana M., 1978).

В настоящее время доказана важная нейрорегуляторная и нейромодулирующая роль пиримидиновых нуклеотидов и нуклеозидов в ЦНС, реализуемая через P2Y рецепторы (Weisman G.A. et al., 2012; Kügelgen I., Hoffmann K., 2016). Установлено участие уридина и его предшественников в процессах пролиферации, дифференцировки, а также лизисе поврежденных клеток; в регуляции процессов сна, в механизмах памяти и нейропластичности. Было показано, что УТФ индуцирует пролиферацию и нейрональную дифференцировку обонятельного эпителия (Jia C. et al., 2009) и увеличивает пролиферацию зрелых нейронов из клеток-предшественников путем активации P2Y2 рецепторов (Grimm I. et al., 2009). УДФ и УТФ стимулируя соответственно P2Y6 и P2Y2 рецепторы активирует фагоцитоз и способствует удалению поврежденных в результате апоптоза клеток фагоцитами (Inoue K. et al., 2009; Elliott M. R. et al., 2009).

В эксперименте у крыс уридин и цитидин проявили себя как промоутеры сна (Honda K. et al., 1984; Inoue S., 1986): 10-часовая интрацереброventрикулярная инфузия 10 пмоль уридина увеличивала частоту

различных фаз сна, но не их продолжительность (Honda K. et al., 1984). Кроме того, внутрибрюшинное введение уридина незадолго до наступления темного периода времени суток приводило к дозозависимому кратковременному избытку ортодоксального сна (Honda K. et al., 1985). Локальное электролитическое разрушение вентролатерального преоптического ядра (центр сна) устраняло данный эффект (Kimura-Takeuchi M., Inoue S., 1993). Интрацереброventрикулярные инъекции производных уридина (N3-бензилуридин, N3-бензил-6-азауридин и N3-фенацилуридин (Yamamoto I. et al., 1987; Yamamoto I. et al., 1985; Koshigami M. et al., 1991; Kimura T. et al., 1992)) вызывали гипнотическую активность и продлевали продолжительность пентобарбитал-индуцированного сна у животных. Кроме того, аналог уридина, N3-альфа-гидрокси-бета-фенетилуридин обладает выраженной снотворной активностью (Kimura T. et al., 2001).

В многочисленных исследованиях на лабораторных животных и в клинике установлено, что длительное применение цитиколина улучшает когнитивные функции, а также влияет на процессы запоминания и извлечения информации из памяти (Teather L. A., Wurtman R. J., 2003, 2005, 2006; Secades J.J., 2016). Следовательно, цитиколин может применяться в лечении возрастных когнитивных нарушений, которые могут быть предшественниками деменции и проявлениями болезни Альцгеймера (Beek E. M., Kamphuis P., 2008). Одним из возможных механизмов нейропротективной активности пиримидинов при болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях может быть активация P2Y2 и P2Y6 рецепторов (Weisman G.A. et al., 2012). Длительное применение предшественников уридина приводит к усилению роста аксонов и увеличивает количество дендритных шипиков, что способствует синаптогенезу в головном мозге (Sakamoto T. et al., 2007; Wurtman R. J. et al., 2009; Pooler A. M. et al., 2012). Pooler A.M. и соавт. (2005) установили, что влияние пиримидинов на нейропластичность связано с активацией P2Y рецепторов. При использовании специфических антагонистов этих рецепторов - сурамина, реактивного синего

2 и пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4-дисульфоновой кислоты наблюдалось нарушение этих процессов (Pooler A. M. et al., 2005).

Интересны данные о противосудорожном и антидепрессивном эффектах пиримидинов, что определяет перспективность исследований цитиколина и других источников уридина в ЦНС с целью их применения для лечения данных заболеваний. Дозозависимый противосудорожный эффект уридина был продемонстрирован несколько десятилетий назад на различных экспериментальных моделях эпилепсии у грызунов (Piccoli F. et al., 1971; Roberts C. A. et al., 1974; Zhao Q. et al., 2008). Кроме того, при моделировании депрессии у крыс уридин показал себя как эффективный антидепрессант (Carlezon W.A. et al., 2005). В клинических исследованиях на 17 здоровых добровольцах впервые был выявлен положительный эффект уридина при лечении пациентов с биполярными расстройствами (Agarwal N. et al., 2010). Показано потенцирующее действие уридина при совместном применении с галоперидолом, что может усиливать антипсихотическую активность типичных нейролептиков и позволило бы снизить терапевтическую дозу и уменьшить риск возникновения некоторых побочных эффектов данных нейротропных препаратов (Agnati L. F. et al., 1989; Myers C. S. et al., 1994). В ряде работ отмечены антиноцицептивные эффекты ЦДФ-холина, реализуемые путем модуляции супраспинальных опиоидных и GABA рецепторов (Каркищенко Н.Н., Страдомский Б.В., 1991).

Таким образом, пиримидиновые нуклеозиды являются потенциально эффективными нейротропными лекарственными препаратами для комплексного подхода в лечения многих неврологических и психиатрических расстройств. Необходимо отметить, что влияние цитидиновых нуклеотидов и нуклеозидов на мембранные рецепторы практически не исследовано, но в то же время установлены рецепторные механизмы действия уридина и его производных, как основного метаболита ЦДФ-холина в ЦНС.

1.2.2. Физиологическая роль и терапевтическая значимость пиримидиновых рецепторов в ЦНС

В настоящее время идентифицированы специфические мембранные рецепторы, относящиеся к подклассу Р2 рецепторов, лигандами которых являются пурины и пиримидины, в частности УТФ и УДФ (Kügelgen I., Hoffmann K., 2016). Информация о потенциальных механизмах действия этих нуклеотидов только начинает накапливаться. Появляются данные о топографическом распределении пиримидиновых рецепторов и месте их связывания в головном мозге (Weisman G.A. et al., 2012). Рецепторы P2Y относятся к семейству пуриновых и пиримидиновых, связанных с G-белком, стимулируемые нуклеотидами: АТФ, АДФ, УТФ, УДФ и УДФ-глюкоза (Abbracchio M.P. et al., 2006; Burnstock G., 2007; Lazarowski E. R., 2010).

Таблица 1.1

Пиримидиновые рецепторы и их локализация в центральной нервной системе

	Эндогенные агонисты	Локализация рецептора
P2Y2	УТФ=АТФ	Нейроны и глиальные клетки в различных отделах головного мозга
P2Y4	УТФ>АТФ	
P2Y6	УДФ	
P2Y14	УДФ сахара	Преимущественно астроциты, микроглия
Сопряженный с G-белком рецептор 17	УДФ, УДФ сахара, Цистеинил-лейкотриены (Cys-LT)	Нейроны в нескольких отделах мозга, но не в астроцитах

На сегодняшний день клонировано 8 подтипов рецепторов P2Y у людей: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 и P2Y14 (Weisman G.A. et al., 2012; Kügelgen I., Hoffmann K., 2016). Пять подтипов этих рецепторов, активируемые пиримидинами, показаны в таблице 1.1 (Burnstock G., 2007; Abbracchio M. P. et al., 2012). Рецепторы P2Y присутствуют почти во всех тканях человека, где они выполняют различные биологические функции, включая вазодилятацию, свертывание крови и иммунный ответ (Erlinge D., 2011). В таблице 1.2 показаны основные агонисты и антагонисты различных пиримидиновых (P2Y2, P2Y4, P2Y6 и P2Y14) подтипов рецепторов и их функциональная значимость.

P2Y2 рецептор играет важную роль в ЦНС, преимущественно в патофизиологических условиях. На моделях in vivo и in vitro было показано, что активация этих рецепторов происходит при воспалении или повреждении (Koshiba M. et. al., 1997; Turner J.T. et. al., 1997; Seye C.I. et. al., 2002; Shen J. et. al., 2004; Schrader A.M. et. al., 2005; Franke H., Illes P., 2006; Kong Q. et. al., 2009), включая повреждение спинного и головного мозга (Franke H., Illes P., 2006; Rodríguez-Zayas A.E. et. al., 2010), что свидетельствует о том, что этот рецептор может играть роль в механизмах нейропротекции. При активации P2Y2 рецепторов усиливается миграция и пролиферация астроцитарных и микроглиальных клеток (Bagchi S. et. al., 2005; Kim H.J. et. al., 2012). Экспрессия P2Y2 рецепторов усиливается провоспалительным цитокином IL-1β (Kong Q. et. al., 2009). Снижение экспрессии этих рецепторов в коре головного мозга также играет роль в патогенезе болезни Альцгеймера (Lai M.K. et. al., 2008). Активация эндотелиальных P2Y2 рецепторов за счет выделения NO сопровождается вазодилятацией (Guns P.J. et. al., 2006; Rieg T. et. al., 2011). Таким образом, P2Y2 рецептор представляет собой многообещающую мишень потенциальных препаратов для лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний.

Таблица 1.2

Агонисты и антагонисты рецепторов P2Y

Рецептор	Агонисты	Антагонисты	Потенциальные терапевтические пути
P2Y2	Эндогенные: АТФ или УТФ Синтетические: UTPγS, Ap 4 A, INS365 (Diquafosol), INS37217 (Denusofol), INS45973, 2'-амино-2'-дезокси-UTP, 6-нитро-UTP, UTPαS, 2'-дезокси UTPaS, 2-тио-UTP, MRS2768, PSB1114	PPADS, сурамин, реактивный синий 2, PSB716	Агонисты могут увеличить миграцию и пролиферацию глиальных клеток, рост нейритов, нейропротективное действие при болезни Альцгеймера
P2Y4	Эндогенные: УТФ (люди), УТФ или АТФ (мыши, крысы). Синтетические: UTPγS, 5-бром-УДФ, INS365 (диквафозол), INS37217 (денусофол), 2'- азидо-2'-дезокси-УДФ.	PPADS, реактивный синий 2	Активация P2Y4 рецепторов может ингибировать пресинаптическое высвобождение глутамата, модулировать функцию гематоэнцефалического барьера и ингибировать ток K + в миоцитах крысы
P2Y6	Эндогенный: УТФ Синтетический: UDPpS, MRS2693, PSB0474, INS48823, α, β-метилен-UDP, 5-бром-UTP	PPADS, сурамин, реактивный синий 2, MRS2567, MRS2578, MRS2575	Активация P2Y6 рецепторов может усиливать фагоцитарную активность микроглии и регулировать механизмы восстановления в ответ на повреждение ЦНС
P2Y14	Эндогенные: УТФ-глюкоза. Другие: УДФ-галактоза, УДФ-глюкуроновая кислота, УДФ-N-ацетилглюкозамин. Синтетические: MRS2690.		Активация P2Y14 R может модулировать воспалительные реакции через выработку хемокинов и цитокинов, а также играет роль в сокращении мышц

Физиологическая роль и участие P2Y4 рецепторов в патологических процессах в ЦНС изучена недостаточно. Этот подтип рецепторов экспрессируется преимущественно на пирамидных нейронах гиппокампа. Активация P2Y4 рецепторов сопровождается торможением высвобождения глутамата (Rodrigues R.J. et. al., 2005). Подобно P2Y2 подтипу, активация P2Y4 рецепторов может быть связана с регуляцией функции ГЭБ и мозгового кровотока (Simard M. et. al., 2003; Zonta M. et. al., 2003).

Рецепторы P2Y6 экспрессируется практически во всех отделах головного мозга, но в большей степени в миндалине, поясной извилине и базальных ганглиях (Moore D. J. et. al., 2001). Активация этого подтипа рецепторов увеличивает фагоцитарную активность микроглии (Koizumi S. et. al., 2007; Liu G.D. et. al., 2009). Также предполагается роль этих рецепторов в механизмах нейропротекции (Boucsein C. et. al., 2003; Kim H.J. et. al., 2012).

Эффекты активации P2Y14 рецепторов и его терапевтическое значение в лечении расстройств центральной нервной системы в значительной степени неизвестны. Данный подтип рецепторов экспрессируется преимущественно в астроцитах человека (Moore D.J. et. al., 2003). Не исключается важная роль этих рецепторов в процессах нейровоспаления (Bianco F. et. al., 2005).

Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что пиримидиновые рецепторы (P2Y2, P2Y4, P2Y6 и P2Y14) могут регулировать защитные механизмы в ЦНС при различных патологических условиях. Ряд эндогенных нуклеозидов, в частности уридин, его предшественники (ЦДФ-холин) и синтетические агонисты P2Y рецепторов можно использовать как потенциальные нейропротективные средства при повреждении головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях. Дальнейшее изучение и разработка средств, специфически действующих на разные подтипы пиримидиновых рецепторов, является перспективным направлением в лечении многих неврологических расстройств. Имеющиеся данные по изучению потенциальных фармакологических эффектов препаратов, влияющих на эти рецепторы важны для понимания механизмов активности

цитиколина в клинической практике, для предупреждения и коррекции ишемических нарушений, при лечении эпилепсии и нейродегенеративных заболеваний (Weisman G.A. et al., 2012; Kügelgen I., Hoffmann K., 2016).

1.2.3. Исследования нейропротективного действия цитиколина при церебральной гипоксии и ишемии в эксперименте

Основной современный подход к фармакологической коррекции патобиохимических нарушений при повреждении нервной ткани - применение лекарственных средств с плейотропным действием, включающем нейрорепаративный, нейропротективный эффекты и модулирование нейропластичности (Candelario-Jalil E., 2008; Morton C.C. et al., 2013).

Таргетным воздействием на ключевые звенья процессов повреждения нервной ткани гипоксического, ишемического, травматического или другого генеза обладает препарат из группы нейропротекторов – цитиколин. В настоящее время цитиколин является достаточно популярным в клинической практике лекарственным препаратом, эффект которого при повреждениях ЦНС доказан и подтвержден во множестве экспериментальных и клинических исследованиях (Dobolyi A. et al., 1998; Kekesi K.A. et al., 2006).

В разных экспериментальных условиях было установлено, что цитиколин предотвращает высвобождение жирных кислот во время церебральной ишемии и гипоксии, а также увеличивает синтез структурных фосфолипидов (Adibhatla R.M., Hatcher J.F., 2002). Используя экспериментальную декапитационную модель глобальной церебральной ишемии Horrocks и соавт. (1981) показали, что введение цитиколина совместно с ЦДФ-этаноламином снижает выделение свободных жирных кислот и увеличивает синтез соответствующих глицерофосфолипидов, предполагая участие фосфотрансфераз холина и этаноламина. Alberghina и соавт. (1981) изучали влияние цитиколина на распределение и включение меченных предшественников глицерина и пальмитата в церебральные фосфолипиды в условиях гипоксии у морских свинок. По сравнению с

контрольной группой, у животных, которым через 10 минут после начала гипоксии внутрибрюшинно вводили 100 мг/кг цитиколина, наблюдалось увеличение специфической радиоактивности липидов и фосфолипидов в очищенных митохондриях, полученных из полушарий головного мозга, мозжечка и ствола. Trovarelli и соавт. (1982) в эксперименте при моделировании глобальной ишемии путем двусторонней перевязки сонных артерий у песчанок обнаружили, что внутрибрюшинное введение цитиколина предотвращает липидные метаболические изменения, которые индуцируются церебральной ишемией, корректируя увеличение уровней свободных жирных кислот и снижение уровня фосфатидилхолина. Цитиколин восстанавливал дисфункцию гематоэнцефалического барьера после ишемии головного мозга с 6-часовой реперфузией у песчанок, а также значительно ограничивал синтез арахидоновой кислоты и лейкотриена С4 в последующие 24 часа после транзиторной ишемии (Rao A.M. et al., 1982). Таким образом, в ранних экспериментальных исследованиях было показано, что препарат может предотвращать разрушение клеточных мембран, уменьшать образование свободных радикалов и обеспечивать естественную защиту нервной системы от окислительного стресса (Adibhatla R.M. et al., 2002, 2005).

Hurtado и соавт. (2005) провели исследование, в котором оценили изменения уровня аденозинтрифосфата в условиях церебральной ишемии на фоне введения цитиколина. При патологических изменениях головного мозга было выявлено резкое увеличение АТФ, которое сопровождалось уменьшением уровня глутамата в пораженной ткани и в системном кровотоке. Увеличение АТФ коррелировало с уменьшением объема инфаркта головного мозга. Авторы предположили, что цитиколин положительно влияет на транспортер глутамата EAAT2 и улучшает поглощение глутамата.

Помимо этого, ЦДФ-холин вовлечен в процессы синтеза ацетилхолина, дефицит которого имеет большое значение в развитии расстройств нейромедиаторного баланса при нейродегенеративных заболеваниях и когнитивных нарушениях (Plataras C. et al., 2000). В исследованиях на

животных цитиколин показал свою биологическую активность, улучшая репарацию после ишемического повреждения нейронов, в том числе и за счет повышения содержание ацетилхолина (Giralt D. et al., 2010).

Исследовательская группа Kakihana (1988) изучала влияние меченного цитиколина на синтез ацетилхолина из глюкозы в коре головного мозга при моделировании 30-минутной ишемии с последующей реперфузией у крыс. Лечение цитиколином улучшало метаболизм глюкозы и значительно восстанавливало синтез ацетилхолина. Авторы пришли к выводу, что цитиколин улучшает энергетический метаболизм мозга в условиях ишемии.

Цитиколин также модулирует нейротрансмиссию ряда катехоламинов. В частности, ЦДФ-холин увеличивает уровни норадреналина в коре и гипоталамусе, а также дофамина в полосатом теле (Cansev M. et al., 2008). Исследователями отмечено, что повышение синтеза дофамина может быть связано с воздействием цитиколина на активность тирозингидроксилазы – фермента, ограничивающего скорость синтеза дофамина (Martinet M. et al., 1981). У животных с возрастными изменениями головного мозга цитиколин увеличивал высвобождение дофамина, приводил к улучшению обучения и памяти, предотвращая развитие когнитивных нарушений на модели хронической церебральной гипоперфузии у крыс (Alvarez X.A. et al., 1999; Lee H.J. et al., 2009). Также ЦДФ-холин увеличивал содержание серотонина в церебральной коре, стриатуме и гипоталамусе (Martinet M. et al., 1981). Boismare и соавторы (1978) в эксперименте с острой гипоксией у крыс внутрибрюшинно вводили 20 мг/кг цитиколина, что приводило к уменьшению вегетативных реакций и нормализации уровня дофамина и норадреналина в мозге. Позже та же группа ученых исследовала влияние цитиколина на уровень вызванных потенциалов коры головного мозга при церебральной ишемии у кошек. При предварительном введении цитиколина в сонные артерии наблюдалось значительное снижение депрессии потенциалов, зарегистрированных с коры головного мозга (Boismare F. et al., 1978). Авторы предположили, что защитные эффекты цитиколина являются по своей

природе метаболическими/биохимическими, а не гемодинамическими, и не исключают прямого действия препарата на центральные дофаминергические структуры.

Экспериментальных исследований профилактического нейропротективного действия цитиколина при гипоксии и ишемии значительно меньше, чем публикаций об его эффективности при назначении в постишемическом периоде. Tornos и соавт. (1983) изучили защитное действие цитиколина в экспериментальной модели гипоксии, вызванной токсическим действием цианида калия. Они обнаружили, что пероральное профилактическое назначение цитиколина в течение 4 дней до моделирования гипоксии оказывает защитный эффект, о чем свидетельствует более продолжительное время жизни у животных, которым вводился препарат. В исследовании Krupinski J. и соавт. (2002) также была установлена высокая эффективность применения цитиколина в профилактическом режиме (за 1 час до моделирования ишемии) в сравнении с лечебным назначением (Krupinski J. et al., 2002). Недавно было показано, что цитиколин ингибирует некоторые внутриклеточные сигналы, участвующие в инициации апоптоза (Krupinski J. et al., 2005; Matyja E. et al., 2008; Sahin S. et al., 2010). Дополнительно необходимо отметить антиагрегантные свойства цитиколина (Gutierrez-Fernandez M. et al., 2012), что может иметь значение при лечении сосудистых заболеваний ЦНС. Все вышеописанные фармакологические эффекты цитиколина доказывают его благоприятный и перспективный профиль для лечения сосудистых заболеваний головного мозга (Adibhatla R.M. et al., 2007; Saver J.L., 2010; Alvarez-Sabín J., Román G.C., 2013). Цитиколин является препаратом выбора для лечения цереброваскулярных заболеваний, поскольку его клиническое применение оправдано фармакологическими эффектами, которые он оказывает на центральную нервную систему (Ghosh S. et al., 2010).

1.2.4. Клинические исследования эффективности цитиколина при ишемическом повреждении ЦНС

Анализ публикаций, посвященных клиническим исследованиям цитиколина, выполненный Milani M. (2003), обнаружил в общей сложности 13 исследований, выполненных на пациентах с ишемическим инсультом. Клиническое применение цитиколина началось с 60-х гг. XX столетия (Saver J.L., 2008). В пилотном плацебо-контролируемом исследовании была установлена эффективность терапии цитиколином в дозе 1000 мг/сут в течение 8 недель после перенесенного ишемического инсульта при восстановлении моторной функции нижних конечностей (Hazama T. et al., 1980). Первое двойное слепое многоцентровое плацебо-контролируемое исследование проводилось в Японии в конце 80- х годов, где изучалось действие цитиколина при инфаркте мозга (Tazaki Y., 1988). Позже аналогичные результаты были получены в ходе проведения многоцентровых международных клинических исследований. В 1997 г. в США стартовало первое двойное рандомизированное исследование с применением перорального цитиколина при остром нарушении мозгового кровообращения ишемического генеза. В этом исследовании проводилась сравнительная эффективность трёх доз: 500, 1000, 2000 мг. В результате было показано, что применение цитиколина в дозе 500 мг оправдано и высокоэффективно (Clark W.M. et al., 2001).

Со временем стремительное усовершенствование диагностических методов нейровизуализации позволило более детально провести оценку нейропротективной активности цитиколина на объем очага ишемического повреждения головного мозга.

На этапе пилотного исследования, в котором приняло участие 12 пациентов с ишемическим инсультом, было достигнуто визуальное подтверждение уменьшения объёма поражения мозга при 6-недельном курсе цитиколина. На втором этапе данного исследования (100 пациентов), не было достигнуто достоверного снижения объёма ишемии в сравнении с группой

плацебо. При проведении тщательного анализа было выявлено, что объём ишемического поражения увеличивался на 180±107% в группе плацебо и 34±19% в группе цитиколина от исходного уровня к 12 неделе терапии. Высокая корреляционная связь между уменьшением поражённого объёма и клиническим улучшением, стала важным открытием в обосновании применения методов нейровизуализации (компьютерная томография, магниторезонансная томография) как аргумент в оценке терапевтической эффективности (Clark W.M. et al., 2001). Так же дозозависимые эффекты цитиколина при ишемическом инсульте изучались в рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании (Clark W.M. et al., 1997) у 259 больных, получавших либо плацебо, либо одну из трех доз цитиколина перорально: 500 мг/сут однократно, 500 мг дважды в день или по 1000 мг дважды в сутки. Лечение начинали в первые 24 часа после начала развития инсульта и продолжали в течение 6 недель. По итогам во всех группах, получавших цитиколин, было достигнуто улучшение функционального исхода и уменьшение неврологического дефицита по сравнению с плацебо.

Davalos A. и соавторы (2002) в четырех проспективных рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях изучили более 1500 пациентов с ишемическим инсультом, получавших цитиколин перорально в течение первых 24 часов и в последующие 6 недель. К 12-й неделе исследования функциональное восстановление было достигнуто соответственно в 25 % в группе цитиколина и в 20 % – в группе плацебо.

Эффективность долгосрочной терапии цитиколином постинсультных когнитивных нарушений специально изучалось в открытом сравнительном рандомизированном исследовании, в котором сравнивались лечение цитиколином и стандартная ноотропная терапия (Alvarez-Sabin J. et al., 2013). В исследование включали больных, перенесших инсульт не более 1,5 месяцев ранее, и далее рандомизировали их по полу, возрасту, образованию и виду

инсульта в две группы. В исследование было включено 347 пациентов (средний возраст 67,2 года), из них 172 человека получали цитиколин в дозе 1000 мг в сутки и 175 вошли в контрольную группу. В период наблюдения (через 6 месяцев и через год) установлены достоверно лучшие исходы в группе цитиколина по следующим когнитивным показателям: исполнительные функции, внимание и ориентация во времени. По заключению авторов, терапия цитиколином на протяжении 12 месяцев у пациентов с впервые развившимся инсультом является безопасной и эффективной в плане уменьшения когнитивных нарушений.

Таким образом, можно сделать выводы, что цитиколин улучшает энергетический метаболизм мозга, модулирует центральную нейротрансмиссию и активирует процессы репарации клеток. Большинство исследователей, как в эксперименте, так и в клинике продемонстрировали, что длительное лечение цитиколином в постишемическом периоде приводит к улучшению функционального и морфологического восстановления за счет преимущественного влияния на синтез фосфолипидов в мембранах нейронов и участия холина в нейрохимических процессах. Малоизученными остаются вопросы об нейропротективной эффективности профилактического (до ишемии) назначения цитиколина и исследование его потенциальных рецепторных мишеней.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования и используемые препараты

Работа выполнена на 51 беспородных крысах-самцах, массой 220-250 г. и 83 белых беспородных мышах-самцах, массой 20-25 гр. До экспериментов животных содержали в лабораторном виварии при температуре помещения 18-22 ^{o}C и естественном световом режиме; использовали стандартную диету, состоящую из брикетированного корма, овощей и воды. Опыты на животных осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР N 755 от 12.08.1977 г.). Все эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН. Дизайн исследования согласуется с приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 N 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Моделирование ишемии головного мозга, вживление электродов, а также другие инвазивные процедуры проводили под адекватным обезболиванием (золетил-100, 7,5 мг/кг, внутрибрюшинно).

В таблице 2.1. представлено распределение животных по группам в зависимости от проведенных экспериментальных исследований, используемые препараты и вещества. Всего было проведено 2 серии экспериментов. В первой серии проводилась сравнительная оценка защитного профилактического и лечебного эффекта цитиколина при моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга у крыс. Во второй серии исследовали нейропротективное действие цитиколина и возможные рецепторные механизмы действия этого препарата при моделировании глобальной странгуляционной ишемии у мышей.

Первая серия опытов была проведена на 51 крысе, массой 220-250 гр. Все экспериментальные животные этой серии были разделены на 4 основные группы.

Таблица 2.1

Группы экспериментальных животных и используемые препараты

	Название экспериментальной группы	Количество животных	Используемые препараты и вещества
Крысы (N=51): моделирование фокальной 60 минутной транзиторной ишемии головного мозга с оценкой неврологического статуса и концентрации нейроспецифических белков (NSE и S100b) в плазме крови, гистологическое исследование			
1.	Ложнооперированная группа	8	Физиологический раствор (NaCl) 0,9%, 1 мл в/б
2.	Контрольная группа	17	Физиологический раствор (NaCl) 0,9%, 1 мл в/б
3.	Первая экспериментальная группа	14	Цитиколин, 2000 мг/кг, в/б, ежедневно в течение 5 суток после моделирования ишемии
4.	Вторая экспериментальная группа	12	Цитиколин, 2000 мг/кг, в/б за 60 минут до моделирования ишемии
Мыши (N=83): моделирование глобальной странгуляционной ишемии головного мозга. Оценка продолжительности гаспинга, регистрация локального мозгового кровотока, биоэлектрической активности головного мозга			
1.	1 (контрольная) группа	20	Физиологический раствор (NaCl) 0,9%, 0,1 мл в/б
2.	2 экспериментальная группа	15	Цитиколин, 2000 мг/кг, в/б за 30 минут до моделирования ишемии
3.	3 экспериментальная группа	14	Цитиколин, 2000 мг/кг, в/б за 60 минут до моделирования ишемии
4.	4 экспериментальная группа	18	MRS2578, 25 мкг/кг за 90 минут до моделирования ишемии
5.	5 экспериментальная группа	16	MRS2578, 25 мкг/кг за 90 минут до моделирования ишемии, Цитиколин, 2000 мг/кг, в/б за 60 минут до моделирования ишемии

Первая ложнооперированная группа (n=8) была представлена крысами, у которых осуществляли оперативный доступ к брахицефальным артериям без последующего моделирования ишемии головного мозга. Назначение этой группы заключалось в исключении влияния травматического хирургического вмешательства на неврологические, патобиохимические и гистопатологические проявления ишемии головного мозга в других экспериментальных группах.

Вторая контрольная группа (N=17) была представлена животными, у которых осуществляли моделирование фокальной транзиторной 60 минутной ишемии головного мозга по разработанной нами методике (патент на изобретение RU2639787C1). В ложнооперированной и контрольной группах за 60 минут до осуществления доступа к брахицефальным артериям в/б вводили 1 мл 0,9% физиологического раствора NaCl.

В третью группу (первая экспериментальная группа, N=14) были включены крысы, у которых осуществляли моделирование 60 минутной транзиторной ишемии головного мозга с последующим постреперфузионным (сразу после ишемии) и ежедневным в/б введением цитиколина (2000 мг/кг).

В четвертой группе крыс (вторая экспериментальная группа, N=12) моделировали ишемию головного мозга по предложенной методике на фоне предварительного, за 60 минут до окклюзии левой СМА, в/б введения 2000 мг/кг цитиколина.

Вторая серия экспериментов была выполнена на 83 мышах-самцах, весом 20-25 гр. Все животные этой серии были разделены на 5 основных групп (таблица 2.1).

В первой (контрольной) группе (N=20) исследовали продолжительность гаспинга и электрофизиологические проявления глобальной ишемии головного мозга у мышей. В этой группе за 60 минут до моделирования ишемии в/б вводили 0,9% физиологический раствор NaCl в эквивалентном объеме 0,1 мл.

Во второй экспериментальной группе (N=15) за 30 минут до моделирования глобальной ишемии головного мозга в/б вводили раствор цитиколина (2000 мг/кг).

В третьей экспериментальной группе (N=14) раствор цитиколина вводили за 60 минут до моделирования глобальной ишемии.

Четвертая экспериментальная группа (N=18) была представлена мышами, которым за 90 минут до моделирования ишемии в/б вводили раствор селективного антагониста пиримидиновых P2Y6 рецепторов MRS2578 (25 мкг/кг).

В пятой группе (N=16) лабораторным животным также за 90 минут до моделирования ишемии в/б вводился раствор MRS2578 (25 мкг/кг) с последующим (за 60 минут до ишемии) в/б введением цитиколина (2000 мг/кг).

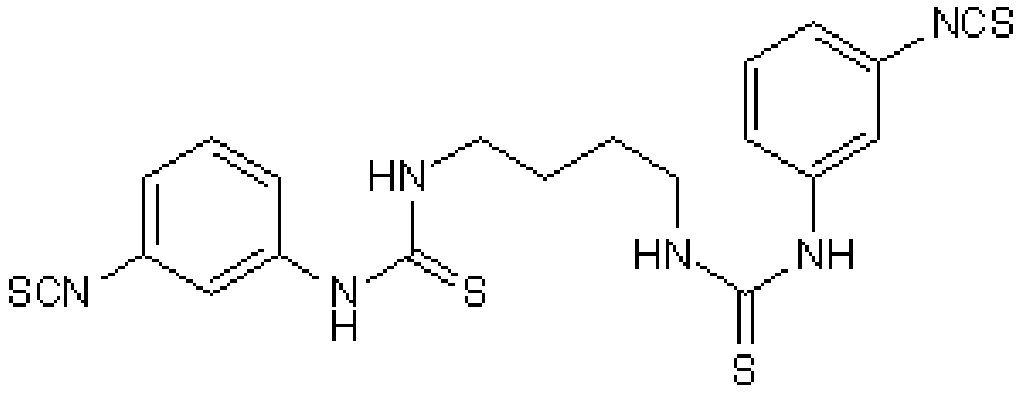


Рис. 2.1. *Химическая формула MRS2578 (C20Y20N6S4, 1,4-ди-((3-изотиоцианатофенил-)-тиоуреидо) бутан).*

Во всех сериях экспериментов в качестве основного исследуемого нейропротективного препарата использовали цитиколин («Цераксон» (Феррер Интернасьональ, С.А., Испания)). В качестве селективного антагониста P2Y6 рецепторов применяли вещество MRS2578 (1,4-ди-((3-изотиоцианатофенил-)-тиоуреидо)бутан, Tocris Bioscience, UK) (Weisman G.A. et al., 2012; von Kügelgen I., Hoffmann K., 2016), которое предварительно растворяли в 0,1% растворе диметилсульфоксида (рис.2.1).

2.2. Моделирование ишемии головного мозга

Использование адекватных и легковоспроизводимых моделей ишемических расстройств в опытах in vivo и in vitro играет огромную роль для систематического изучения патологических механизмов развития ишемии центральной нервной системы и изыскания путей их фармакологической коррекции (Суфианова Г.З. и соавт., 2002; Суфианова Г.З., Шапкин А.Г., 2014; Mergenthaler P. et al., 2004; Sicard K.M., Fisher M., 2009; Sommer C.J., 2017). В зависимости от целей исследования используют модели фокальной или глобальной ишемии головного мозга.

Моделирование фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс

Наиболее простой и малотравматичной моделью фокального нарушения кровообращения является модель переднемозговой ишемии головного мозга с окклюзией ОСА (Koizumi J. et al., 1986; Sicard K.M., Fisher M., 2009). Учитывая особенности и высокую вероятность компенсации кровоснабжения головного мозга у многих животных, используемых в экспериментальной практике, данная модель не всегда удовлетворяет условиям воспроизводимости ишемии (Суфианова Г.З., Шапкин А.Г., 2014; Sommer C.J., 2017). В частности, на примере ложнооперированной серии в нашем исследовании было показано, что транзиторное клипирование ОСА не сопровождается у крыс выраженными клиническими и гистопатологическими нарушениями. В настоящее время наиболее перспективными, а также максимально воспроизводящими патологический процесс в клинике, являются экспериментальные модели интравазальной проксимальной окклюзии СМА (Longa E.Z. et al., 1989; Wang-Fischer Y., 2017). Преимуществами данных моделей являются высокая селективность области ишемических нарушений при малой вариабельности выявляемых гистологических изменений не только в коре головного мозга, но и в подкорковых структурах, низкая летальность

экспериментальных животных и возможность моделирования транзиторного повреждения головного мозга, что позволяет исследовать не только ишемические, но и реперфузионные процессы. В большинстве случаев для моделирования ишемии используется окклюдер изготовленный из нейлоновой нити с силиконовым наконечником (Wang-Fischer Y, 2017). Однако при использовании данного типа окклюдера наблюдается высокая вероятность травматизации внутричерепных сосудов, а также недостаточная степень окклюзии СМА, что сопровождается неоднозначными клиническими и гистологическими результатами (Koizumi J. et al., 1986; Mergenthaler P. et al., 2004; Sicard K.M., Fisher M., 2009; Sommer C.J., 2017). Дополнительным фактором, ограничивающим использование данной модели, является сложность изготовления и необходимость индивидуального подбора окклюдера.

С целью улучшения результатов моделирования фокальной ишемии головного мозга нами предложено использовать в качестве окклюдера нить из материала на основе синтетического полиэстера полигликона, что обеспечивает незначительное набухание и постепенное размягчение окклюдера при контакте с кровью и позволяет предупредить повреждение сосудистой стенки при интравазальном введении, при этом размягченный дистальный конец окклюдера в процессе моделирования легко повторяет изгибы внутренней сонной артерии в полости черепа. На представленную модель получен патент на изобретение RU2639787C1. Общая схема моделирования фокальной ишемии головного мозга у животных контрольной группы представлена на рис. 2.2. У крыс производилось выделение общих, внутренних и наружных сонных артерий слева и общей сонной артерии (ОСА) справа (рис. 2.3а). Для предупреждения проведения окклюдера в систему наружной сонной артерии (НСА), выполняли предварительную перевязку левой НСА (рис. 2.3б).

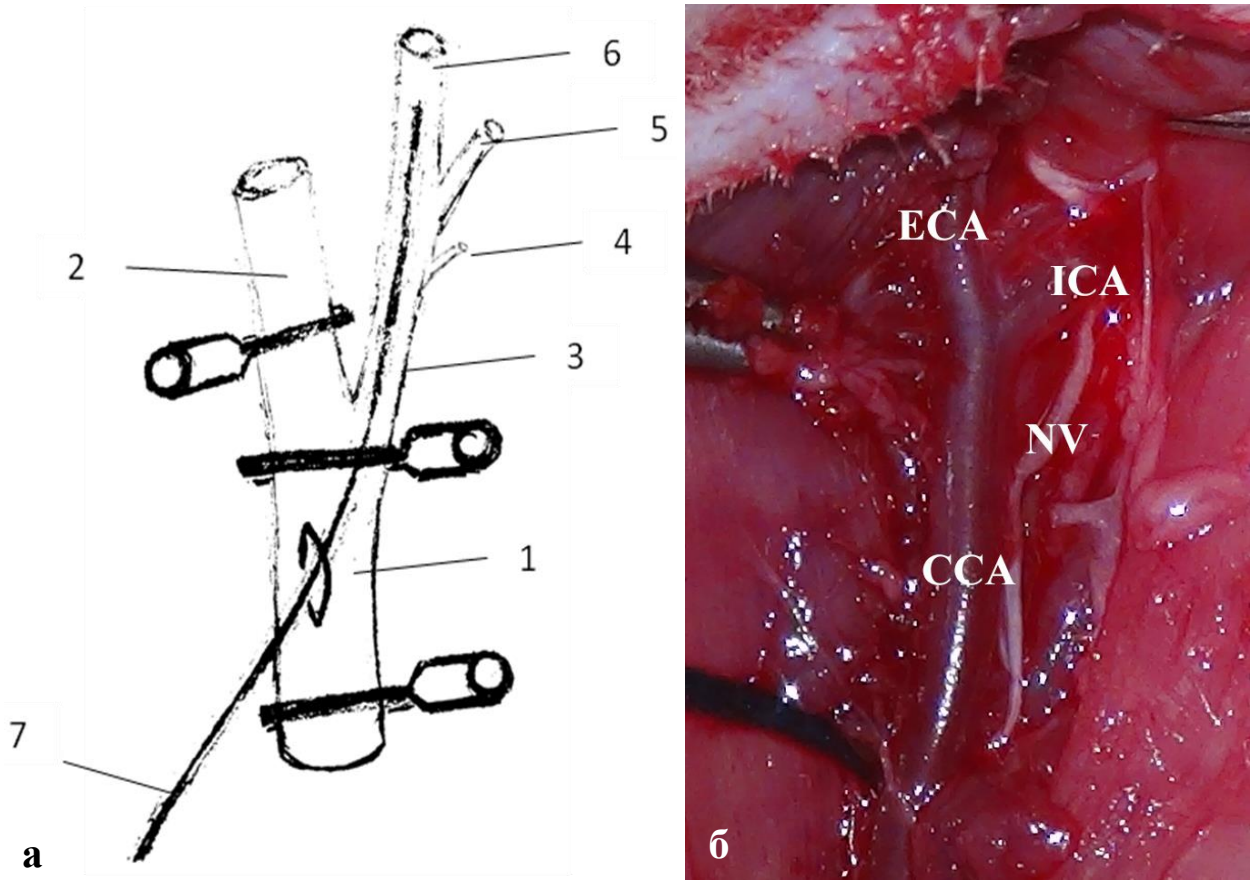


Рис.2.2. *Схема интраваза́льной окклюзии СМА(а) и топография брахицефальных артерий (б) при моделировании ишемии головного мозга: 1 – общая сонная артерия (CCA); 2 – наружная сонная артерия (ECA); 3 – внутренняя сонная артерия (ICA); 4 –a. ophthalmica; 5 – передняя мозговая артерия; 6 – средняя мозговая артерия; 7 – окклюдер; NV -блуждающий нерв (n. vagus).*

Перевязка НСА осуществлялась под микроскопом выше области бифуркации ОСА с использованием атравматического шовного материала с размерами нити от 6.0 до 10.0, что упрощает процедуру перевязки артерии и позволяет избежать травматизации стенок сосудов и синокаротидной зоны.

Также для предупреждения кровотечения, ниже места предполагаемого введения окклюдера, перевязывали левую общую сонную артерию (ОСА). На ОСА справа, с целью уменьшения общей перфузии головного мозга и снижения кровотечения на следующем этапе, накладывали клипсу (рис. 2.3в). Иглой с круглым сечением перфорировали стенку данного сосуда выше места перевязки (рис. 2.3г). Через вкол в ОСА вводился окклюдер, который медленно, для предупреждения повреждения сосуда в месте бифуркации,

проводили на глубину 15-20 мм по ходу общей и внутренней сонных артерий к средней мозговой (СМА) (рис. 2.3д). Окклюдер фиксировали путем наложения временной клипсы на ОСА выше места перфорации стенки сосуда (рис. 2.3е). Данная техника достаточно простая и при наличии определенного опыта продолжительность основного этапа моделирования обычно не превышает 3-5 минут. Через 60 минут окклюдер извлекали, выше места прокола стенки сосуда и введения окклюдера выполняли перевязку ОСА. Также восстанавливали кровоток по ОСА с противоположной стороны.

Для изготовления окклюдера использовался доступный синтетический рассасывающийся монофиламентный шовный материал на основе полигликона (Caprosyn). Для крыс весом 200-300 гр. оптимальной нитью являлась Caprosyn 5.0. Нить нарезали на фрагменты по 30 мм. Для удобства оценки глубины введения окклюдера, на нарезанных фрагментах нити, с использованием перманентного маркера, устанавливали специальные отметки, фиксирующие дистанцию в 15 и 20 мм. Использование при моделировании ишемии синтетического материала на основе полигликона в отличии от других рассасывающихся материалов (например, материала из хромированного кетгута, предложенного нами ранее (Суфианова Г.З. и соавт., 2002)), способных набухать при контакте с кровью, не вызывает местной аллергической и воспалительной реакции. К преимуществам предложенного метода относится также легкость изготовления окклюдера, стандартность предлагаемого окклюдера не требует индивидуального подбора окклюдера нужного диаметра для каждого экспериментального животного.

Для дальнейшего гистологического исследования крыс выводили из эксперимента на 5 сутки после моделирования повреждения головного мозга путем введения летальной дозы препарата для внутривенной анестезии (золетил-100).

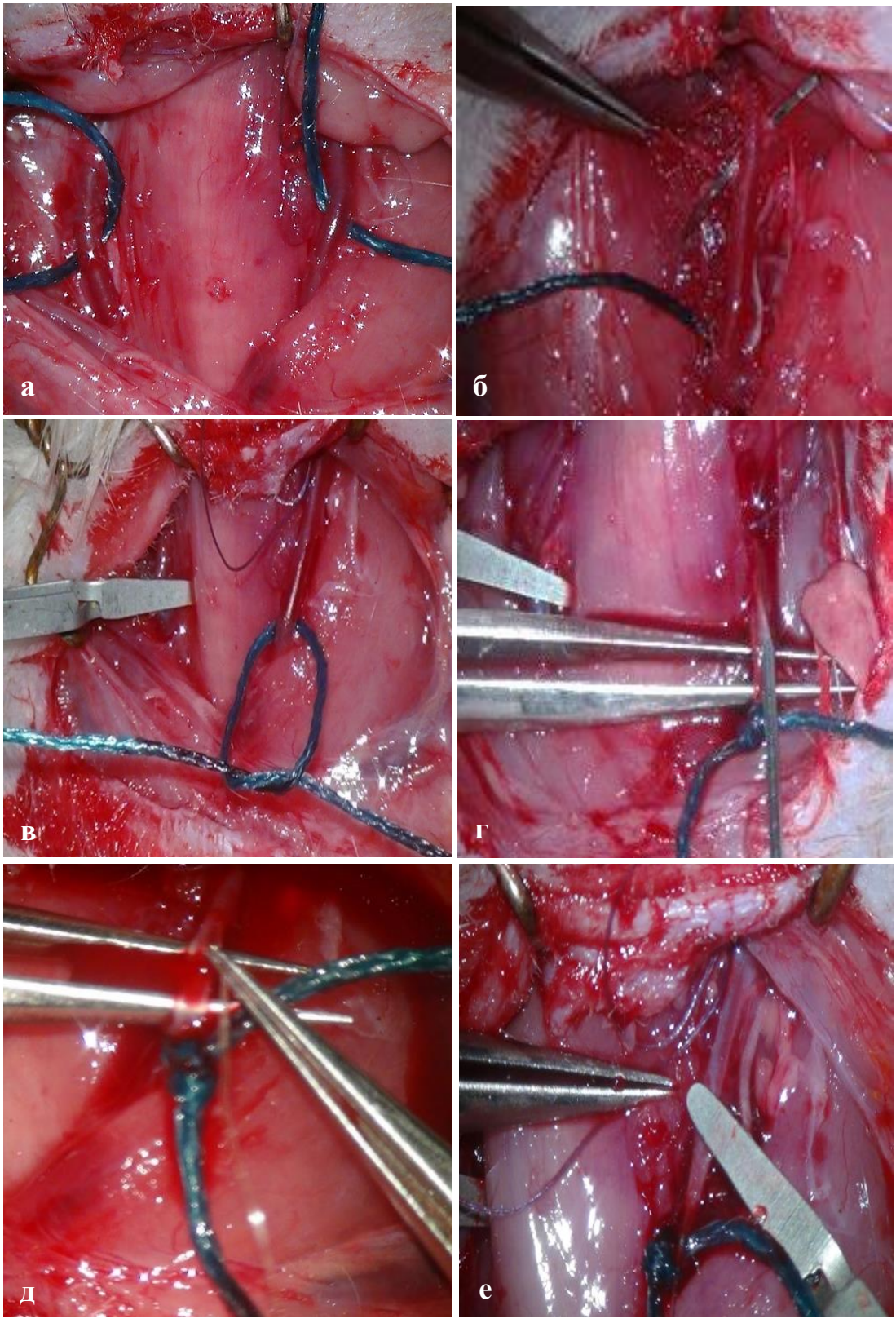


Рис. 2.3. *Этапы интравазальной окклюзии левой средней мозговой артерии: а – выделение общих сонных артерий; б – перевязка общей сонной и наружной сонной артерий слева; в – клипирование правой общей сонной артерии; г – перфорация левой общей сонной артерии выше места перевязки; д - введение окклюдера через общую сонную артерию; е – фиксация окклюдера клипсой в сосудистом русле.*

Моделирование глобальной ишемии головного мозга

Для моделирования глобальной ишемии головного мозга в настоящее время используют различные методические подходы, которые, как правило, очень простые в плане технической реализации. Наиболее удобны данные методы при использовании у мелких экспериментальных животных, например у мышей. Особенностью всех моделей глобальной ишемии является грубое и практически полное нарушение кровоснабжения головного мозга по всем сосудистым бассейнам (Eleff S.M. et al., 1991). Распространенной и простой в реализации является модель полной глобальной ишемии головного мозга, вызванной путем декапитации (Lowry O.H. et al., 1964; Суфианова Г.З., 1994). Однако данный способ приводит к изменению общей электрической емкости, что ограничивает его использование при одновременном проведении электрофизиологического эксперимента, в частности, из-за появления неустранимых артефактов в записи ЭЭГ. С целью моделирования тотальной ишемии головного мозга у мышей мы использовали модификацию модели странгуляционной ишемии, вызванной сдавлением шеи животного пневматической манжеткой (Hirsch H. et al., 1957; Eleff S.M. et al., 1991; Суфианова Г.З., 1994; Кулинский В.И. и соавт., 1996; Волчегорский И.А. и соавт., 2014). Вместо манжеты в наших опытах применялась пластиковая стяжка, что значительно упрощало проведение эксперимента (рис. 2.4). Все эксперименты проводили под поверхностным обезболиванием (золетил-100, 7,5 мг/кг, внутрибрюшинно), позволяющим обездвижить животное и уменьшить вероятность двигательных артефактов. В качестве контроля, для оценки выраженности ишемии проводили измерение локального мозгового кровотока (ЛМК) и одновременную регистрацию уровня постоянного потенциала (УПП) и электроэнцефалограммы (ЭЭГ) с поверхности коры головного мозга. Показателем эффективности данного способа моделирования ишемии являлось снижение ЛМК до 5% и ниже от исходного значения, негативизация УПП, отражающая развитие терминальной

деполяризации нервной ткани и депрессия амплитуды ЭЭГ в первые 10-25 секунд до 5-20% от начального значения.

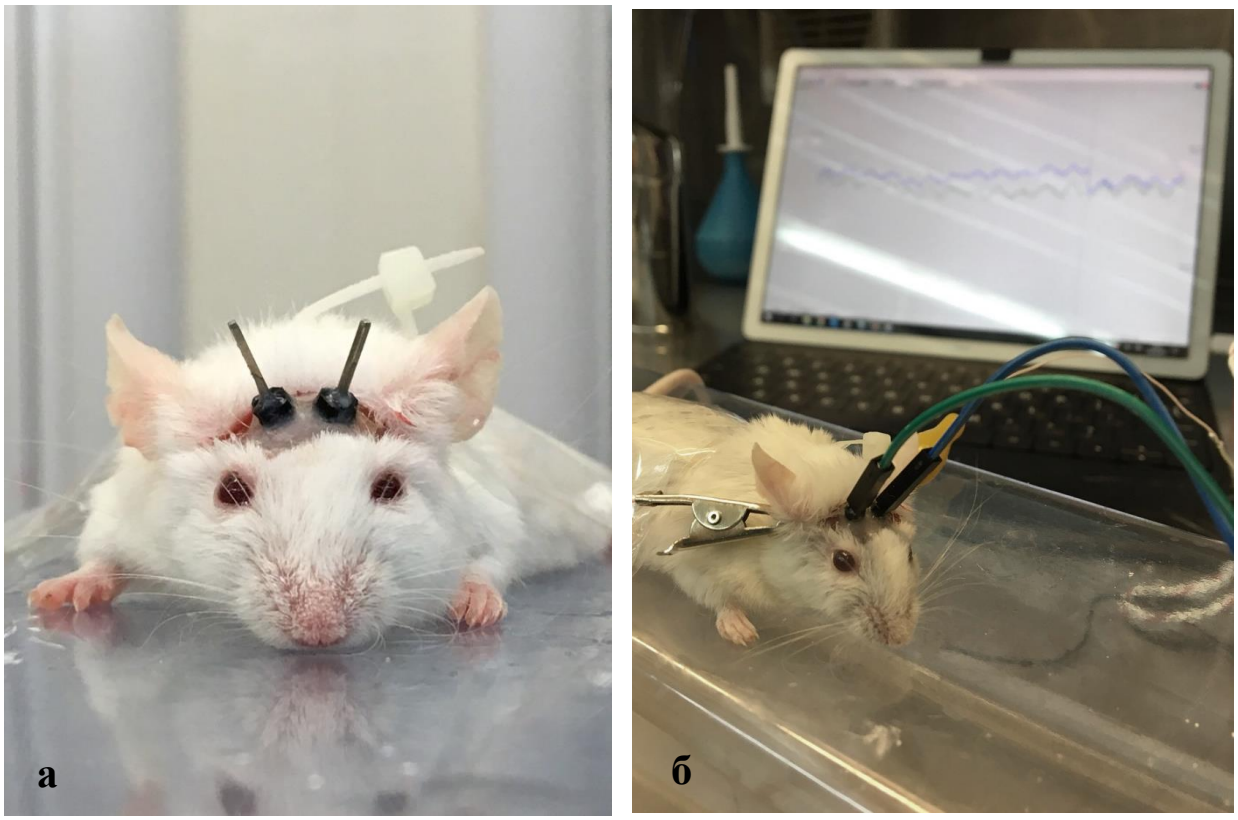


Рис. 2.4. *Моделирование глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей и проведение электрофизиологического эксперимента.*

2.3. Общебиологические, неврологические и физиологические методы исследования в эксперименте

Неврологическая оценка устойчивости головного мозга к фокальной и глобальной ишемии у лабораторных животных

Оценку выраженности повреждения головного мозга при моделировании фокальной ишемии у крыс осуществляли до ишемии и в последующие 5 суток после моделирования повреждения с применением известных неврологических тестов: 4х бальной шкалы Бедерсона (Bederson J.B. et al., 1986) (таблица 2.2.) и шкалы оценки неврологических нарушений McGraw с модификациями Ohno K. (Ohno K. et al., 1984; McGraw C.P., 1977) (таблица 2.3). У крыс оценивали расстройства чувствительности, нарушение

произвольных движений, координации и выпадение рефлексов. Для выполнения теста Бедерсона крысу приподнимали за хвост на высоту 1 м над уровнем пола. В норме крысы тянут передние конечности к полу, при наличии гемипареза (1 балл) наблюдается сгибание передней лапы.

Таблица 2.2.

Шкала Бедерсона (Bederson J.B. et al., 1986)

Неврологический симптом	Индекс повреждения (балл)
Норма	0
Умеренное расстройство (сгибание передней лапы)	1
Выраженное расстройство (+ снижение противодействия боковому толчку)	2
Грубые нарушения (+ хождение по кругу)	3

Таблица 2.3.

Шкала оценки неврологических нарушений McGraw с модификациями Ohno K. (McGraw C.P., 1977; Ohno K. et al., 1984)

Неврологический симптом	Индекс повреждения (баллы)
Взъерошенность волосяного покрова или тремор	1
Притупление чувствительности, вялость, замедленность движений	1
Изменения слуха (прижатие ушей)	1
Запрокидывание головы	3
Птоз	2
Парез конечностей	3
Манежные движения	3
Судороги или двигательная гиперактивность	3
Коматозное состояние	6

Для оценки выраженных расстройств (2 балла), животное помещали на гладкую скользкую поверхность и мягко надавливали сбоку, позади передней конечности, здоровое животное одинаково сопротивляется скольжению в обоих направлениях. В случае грубых нарушений (3 балла) дополнительно возможно появление манежных движений (хождение по кругу), отражающее

повреждение подкорковых ядер и нигростриарной системы (Бонь Е.И., Максимович Н.Е., 2014). При использовании шкалы McGraw интегральная оценка неврологического дефицита выполнялась путем суммирования баллов согласно выявленным нарушениям. Для оценки «сенсомоторной» асимметрии и наличия пареза взора у крыс выполняли угловой тест (corner test) (Schallert T. et al., 1982; Бонь Е.И., Максимович Н.Е., 2014). Для выполнения этого теста крыса помещалась между двумя вертикальными поверхностями. Здоровые крысы поворачиваются как влево, так и вправо случайно. У ишемизированных животных развивается игнорирование половины пространства (неглект) (Beschin N., 1997), поэтому они поворачиваются преимущественно в здоровую сторону. Оценивалось число поворотов в каждую сторону в 10 попытках. Исследование устойчивости головного мозга к глобальной ишемии у мышей проводили путем использования количественных показателей – латентного периода (появления первых явных агональных дыхательных движений) и продолжительности гаспинга (gasping - агональное или терминальное дыхание), которые определяли по секундомеру до последнего открывания рта (Суфианова Г.З., 1994; Кулинский В.И. и соавт., 1996; Волчегорский И.А. и соавт., 2014).

Исследование локального мозгового кровотока

Исследование локального мозгового кровотока проводили у мышей в серии экспериментов по моделированию глобальной ишемии головного мозга. Основным показателем интенсивности мозгового кровообращения является объемная скорость кровотока в мозге, которую можно измерить различными экспериментальными методами. Одним из эффективных, достоверных и неинвазивных способов регистрации этого параметра как в эксперименте, так и в клинике является метод лазерной допплеровской флоуметрии (Тихомирова И.А. и соавт., 2012). Количественное изучение объемного мозгового кровотока в наших экспериментах выполняли с использованием компьютеризованного

допплерометра BLF 21CD (Transonic System Inc. USA). Для проведения исследования у мышей высверливали трефинационные отверстия в проекции теменных долей с двух сторон, через которые на поверхность коры головного мозга устанавливали 2 датчика диаметром 1 мм с последующей их фиксацией в специальном устройстве. Объемный мозговой кровоток выражался в мл/мин/100 г ткани.

Имплантация электродов и запись биоэлектрической активности головного мозга

Регистрацию биоэлектрической активности головного мозга выполняли у мышей в серии экспериментов по моделированию глобальной ишемии головного мозга. С этой целью, под адекватным обезболиванием (Золетил-100, 7,5 мг/кг) за 2-3 часа до проведения основного эксперимента, после предварительной фиксации животного в стереотаксическом аппарате, осуществляли вживление хлорсеребряных электродов под кости черепа в проекции теменной коры правого и левого полушарий (рис. 2.5.). В черепе высверливались отверстия диаметром 0,3-0,5 мм. После установки крепление электродов осуществляли с помощью быстроотвердевающей пластмассы («Акродент»). Хлорсеребряные электроды для электрофизиологических экспериментов изготовляли из серебряной проволоки диаметром 300 мкм. Хлорирование электрода осуществляли током 18 мА/см2 в 0,1н растворе соляной кислоты в течение 30 минут со сменой направления тока 3 раза.

Оценку функционального состояния головного мозга проводили путем одновременной регистрации медленной электрической активности (ЭЭГ), как показателя функциональной активности, и УПП, отражающего уровень поляризации нервной ткани. Референтный электрод располагали на правой ушной раковине. Запись электрофизиологических показателей осуществляли непрерывно после стабилизации электроэнцефалограммы, не ранее чем через 20 минут после начала исследования.

Рис. 2.5. *Имплантация и фиксация электродов на поверхности коры головного мозга у мышей.*

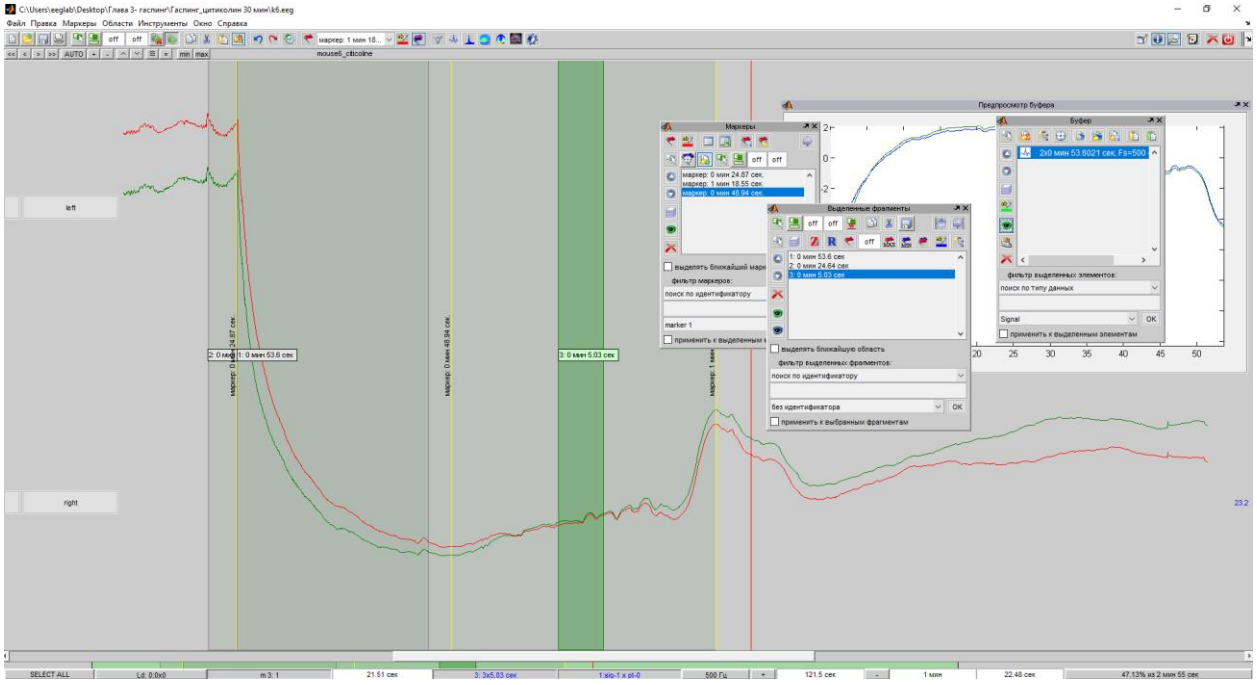


Рис. 2.6. *Интерфейс программы для записи и анализа биоэлектрической активности головного мозга.*

Регистрацию биоэлектрической активности проводили с 2х точек коры головного мозга по униполярной методике с помощью усилителя постоянного тока на основе микросхемы ADS1298 (Texas Instruments, USA). Полученные данные оцифровывали с частотой 500 Гц и вводили в компьютер для

дальнейшей математической обработки. Построение амплитудного спектра ЭЭГ осуществляли с помощью алгоритма быстрого преобразования Фурье (Гнездицкий В.В., 2000; Суфианов А.А. и соавт., 2010) с использованием оригинальной прикладной программы для анализа биоэлектрической активности, написанной на языке Matlab (рис.2.6). Эпохи анализа данным методом составляли от 1 до 10 сек. Для математической обработки брали только безартефактные участки. Значения амплитудного спектра усредняли по 4 частотным диапазонам: дельта (0,5-3 Гц), тета (3-8 Гц), альфа (8-12 Гц) и бета (12-20 Гц). Суммарную амплитуду медленной электрической активности рассчитывали путем усреднения амплитуд всего диапазона анализируемых частот.

Исследование концентрации биохимических маркеров повреждения головного мозга в сыворотке крови: NSE и S-100b

Исследование концентрации нейроспецифических белков (NSE и S-100b) в плазме крови осуществляли у крыс в первой серии экспериментов при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга. С этой целью у всех обследуемых животных производили исследование образцов плазмы венозной крови, полученной путем пункции бедренной вены за сутки до начала эксперимента и на 1, 3 и 5 сутки после моделирования ишемического повреждения головного мозга. Содержание NSE и S-100b определяли на анализаторе Elecsys 1010 (Швейцария). Концентрацию нейроспецифической енолазы (NSE) в плазме крови выражали в мкг/мл, концентрацию белка S100b - в нг/мл.

Гистологическое исследование головного мозга крыс

С целью оценки гистопатологических нарушений при моделировании фокальной транзиторной ишемии у крыс всех экспериментальных групп на 5 сутки (либо в другие сроки, если животное погибало раньше) после эвтаназии

и декапитации извлекали мозг из полости черепа с последующей его фиксацией в забуференном по Лилли 10% растворе формалина. Далее из парафиновых блоков при помощи микротома готовили фронтальные срезы толщиной 5 мкм. Для обзорной общегистологической оценки использовали фронтальные срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. На окрашенных препаратах под световым микроскопом проводили качественный и количественный морфологический анализ полей CA1, CA2, CA3 гиппокампа и слоев II, III и V сенсомоторной коры головного мозга (S1-S2), а также базальных ганглиев в соответствии со стереотаксическим атласом крысы (Paxinos G., Watson C., 1998) (рис. 2.7). Морфологически неизмененные нейроны оценивали в соответствии с существующими критериями оценки: четко очерченное ядро эллипсоидной или округлой формы; хорошо различимые ядрышки, расположенные в центре ядра; ядро немного темнее, чем окружающий нейропиль; цитоплазма нейронов четко отграничена от окружающего нейропиля. Оценку степени гистопатологических изменений производили по 4-х бальной гистопатологической шкале, учитывающей распространенность повреждения нервных клеток в различных отделах головного мозга (таблица 2.4). Суммарный гистопатологический балл подсчитывался как сумма баллов изменений в коре головного мозга, гиппокампе и базальных ганглиях.

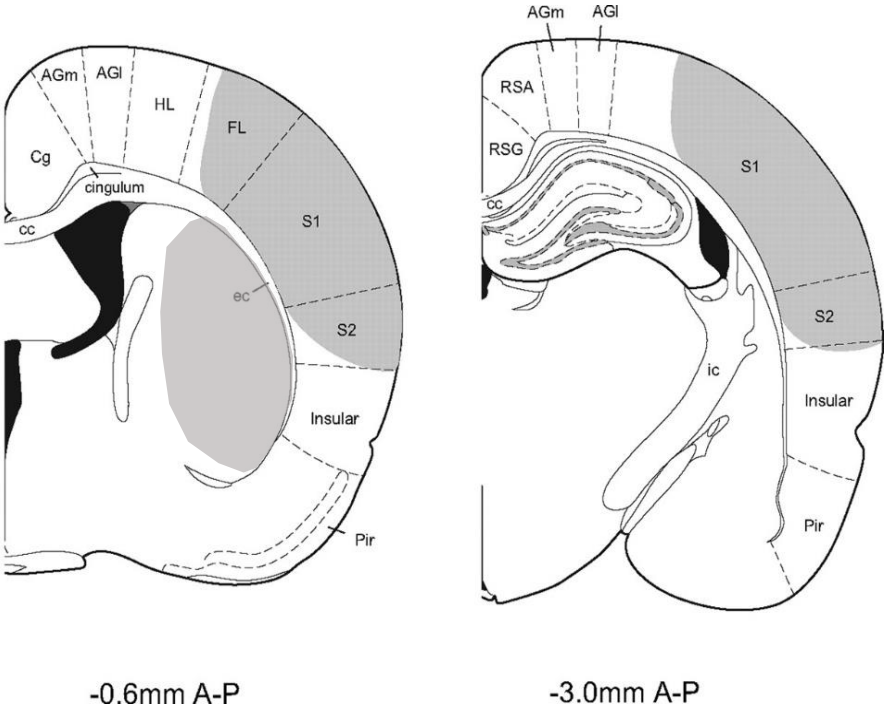


Рис. 2.7. *Схематичное изображение фронтальных срезов головного мозга крысы. Серым цветом выделены анализируемые области (S1-S2, CA1-CA3, GPu).*

Таблица 2.4.

Гистопатологическая шкала

балл	Распространённость ишемических изменений
0	без признаков повреждения
1	отдельные повреждения нервных клеток
2	повреждение боле 50% нервных клеток
3	тотальное повреждение

2.4. Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Office 365) и Matlab 7.14 (MathWorks, Inc). Совокупные частоты и показатели выживания оценивали с помощью метода Каплана-Мейера. Категорийные данные были представлены частотами и процентами. Порядковые категорийные данные после ранжирования обрабатывались с использованием методов статистического анализа количественных данных. Для количественных и альтернативных признаков рассчитывали среднее и стандартную ошибку средней. Для оценки статистической значимости полученных результатов использовали параметрический критерий t – Стьюдента и непараметрический критерий U – Уилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $P < 0,05$. Связь между параметрами оценивали с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Результаты математического и статистического анализа приведены в виде таблиц и рисунков.

ГЛАВА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО И ЛЕЧЕБНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТИКОЛИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ФОКАЛЬНОЙ ТРАНЗИТОРНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

3.1. Неврологические нарушения при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс на фоне введения цитиколина

При моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга у всех крыс контрольной группы выявлялись типичные неврологические признаки ишемического повреждения головного мозга - гиподинамия, правосторонний гемипарез, атаксия. У 6 из 17 крыс (35,3%) данной группы дополнительно определялись признаки нарушения кровоснабжения тканей глазного яблока с соответствующей стороны, связанные вероятно с окклюзией a. ophthalmica (рис. 3.1).

Рис. 3.1. *Гемипарез у крысы контрольной группы на 3 сутки после моделирования ишемии головного мозга.*

Средний неврологический балл по шкалам Бедерсона и McGraw за все 5 суток наблюдения у крыс контрольной группы составлял соответственно 2,5±0,1 и 9,3±0,7 (рис. 3.2, 3.3). В группе ишемизированных крыс развивался двигательный неглект левой половины пространства, поэтому такие крысы в

данном тесте поворачивались преимущественно в правую сторону. Игнорирование левой половины пространства и повороты в здоровую сторону при проведении углового теста (Corner test) в исследуемой группе наблюдалось в среднем в 7,3±0,2 попытках из 10 у каждой крысы (у ложнооперированных крыс это значение составляло 5,11±0,29 из 10 попыток, P<0,01) (рис. 3.4). Данные неврологические изменения существенно отличались от проявлений неврологического дефицита у крыс ложнооперированной серии, где умеренный неврологический дефицит, связанный с ранним послеоперационным угнетением двигательной активности экспериментальных животных, выявлялся только с использованием шкалы McGraw у 3-х животных из 8 в первые 2 суток после операции, и в среднем, за первые 5 суток составлял 0,25±0,1. Неврологические нарушения выявляемые с использованием различных шкал у ишемизированных крыс в определенной степени коррелировали с друг другом. Наибольшее соответствие было выявлено при использовании шкал Бедерсона и McGraw, корреляция между которыми составляла 0,93 (P<0,01). Взаимосвязь между результатами оценки неврологического дефицита по шкалам Бедерсона и McGraw и данными углового теста была несколько меньше и составляла соответственно 0,71 (P<0,01) и 0,79 (P<0,01). Общая летальность экспериментальных животных и группы контроля при моделировании транзиторной 60 минутной фокальной ишемии головного мозга составила 58,8±12,7% (рис. 3.5), средняя продолжительность жизни крыс контрольной группы с учетом выведения их из эксперимента на 5 сутки – 3,6±0,5 суток (рис. 3.6). Корреляция летальности с суммарными неврологическими нарушениями, выявляемыми по шкалам Бедерсона, McGraw и с использованием углового теста составляла 0,57 (P<0,05), 0,65 (P<0,05) и 0,49 (P<0,05).

У крыс первой экспериментальной группы, на фоне лечебного ежедневного в/б введения цитиколина, не смотря на некоторую тенденцию к более низким значениям показателей, существенных отличий

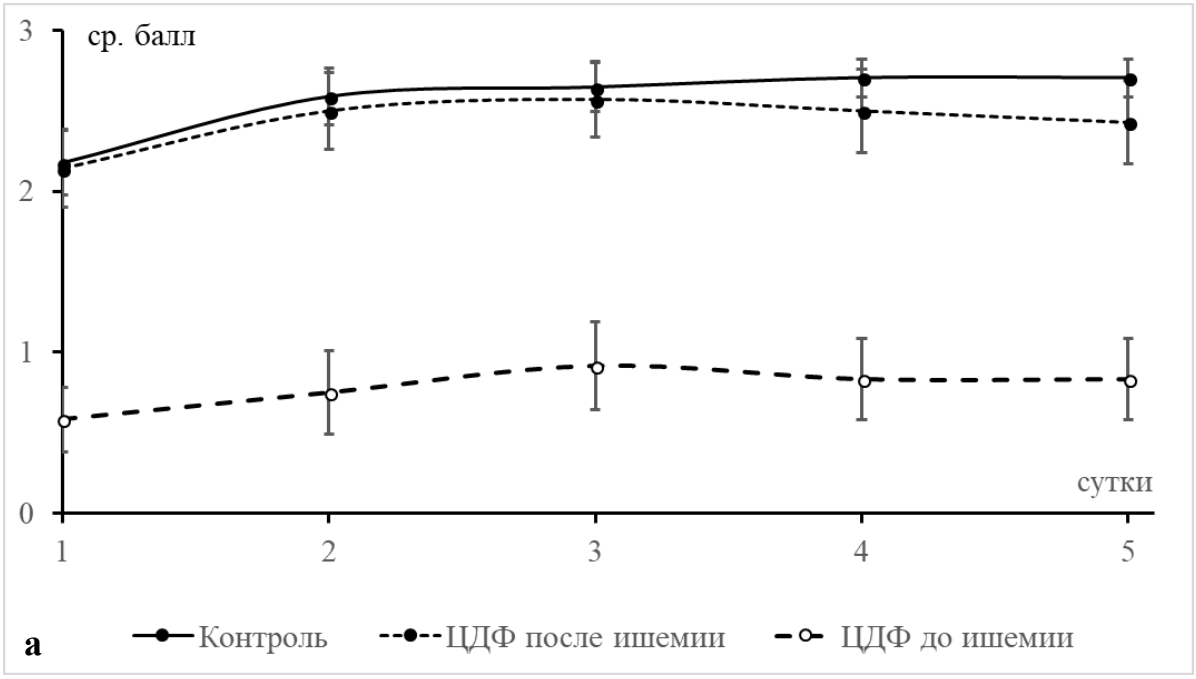
неврологических проявлений и общей летальности экспериментальных животных от контрольной группы не наблюдалось. Средний неврологический балл с использованием шкал Бедерсона и McGraw у крыс данной группы в первые 5 суток эксперимента составлял соответственно 2,4±0,2 и 8,8±0,9 (рис. 3.2, 3.3). Игнорирование левой половины пространства (неглект) и число поворотов в правую сторону при проведении углового теста в исследуемой группе наблюдалось в среднем в 7,2±0,5 попытках из 10 (P<0,01 в сравнении с исходным, дооперационном уровнем) (рис. 3.4). Общая летальность крыс первой экспериментальной группы составила 42,9±0,1%, средняя продолжительность жизни на 8,3% превышала аналогичные значения в контрольной группе и составляла 3,9±0,4 дня (рис. 3.5, 3.6).

Наиболее существенное защитное действие цитиколина по данным неврологического тестирования отмечалось при его профилактическом назначении за 60 минут до моделирования ишемии головного мозга у крыс второй экспериментальной группы. Средний неврологический балл с использованием шкал Бедерсона и McGraw у животных данной группы за 5 суток наблюдения составлял соответственно 0,8±0,2 и 2,1±0,8 (P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами) (рис. 3.2, 3.3). Неглект левой половины пространства при проведении углового теста наблюдался в среднем в 5,8±0,4 попытках из 10 (P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами), что статистически не отличалось от исходного доишемического уровня (5,1±0,3) (рис.3.4). В данной группе наблюдалась минимальная летальность – за все время эксперимента погибло 2 из 12 крысы на 2 и 3 сутки наблюдения, общая летальность составила 16,7±11,7% (P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами), а средняя продолжительность жизни 4,6±0,3 дня (P<0,05) (рис. 3.5, 3.6).

Отсутствие существенной разницы между продолжительностью жизни животных контрольной и первой экспериментальных групп и выраженное снижение летальности во второй экспериментальной группе, при

моделировании ишемии головного мозга на фоне профилактического введения цитиколина, отчетливо видно при построении кривой Каплан-Мейера (рис. 3.7).

Таким образом, цитиколин при профилактическом введении обладает выраженным защитным действием при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга, что проявляется значительно меньшим неврологическим дефицитом и летальностью экспериментальных животных в сравнении с контрольной группой. Лечебное назначение цитиколина в раннем постишемическом периоде (первые 5 суток) не вызывает существенного улучшения неврологических функций и не приводит к снижению летальности и удлинению продолжительности жизни ишемизированных животных. Полученные результаты предполагают наличие рецепторных механизмов участвующих в реализации нейропротективного эффекта цитиколина.



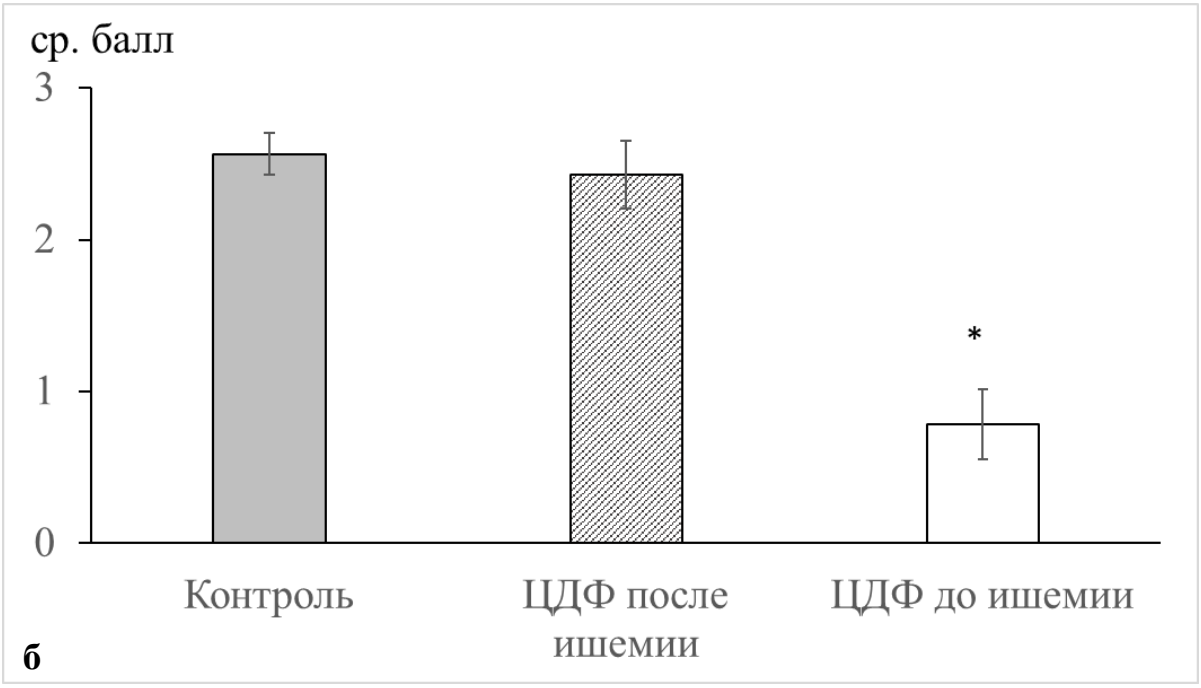


Рис. 3.2. *Динамика неврологического дефицита (а) и средний неврологический балл (б) по шкале Бедерсона в течение первых 5 суток наблюдения после 60-минутной окклюзии левой СМА: «Контроль» - контрольная группа (моделирование ишемии головного мозга); «ЦДФ после ишемии» - первая экспериментальная группа (моделирование ишемии головного мозга с последующим ежедневным лечебным в/б введением цитиколина); «ЦДФ до ишемии» (моделирование ишемии головного мозга на фоне профилактического в/б введения цитиколина). * P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами.*

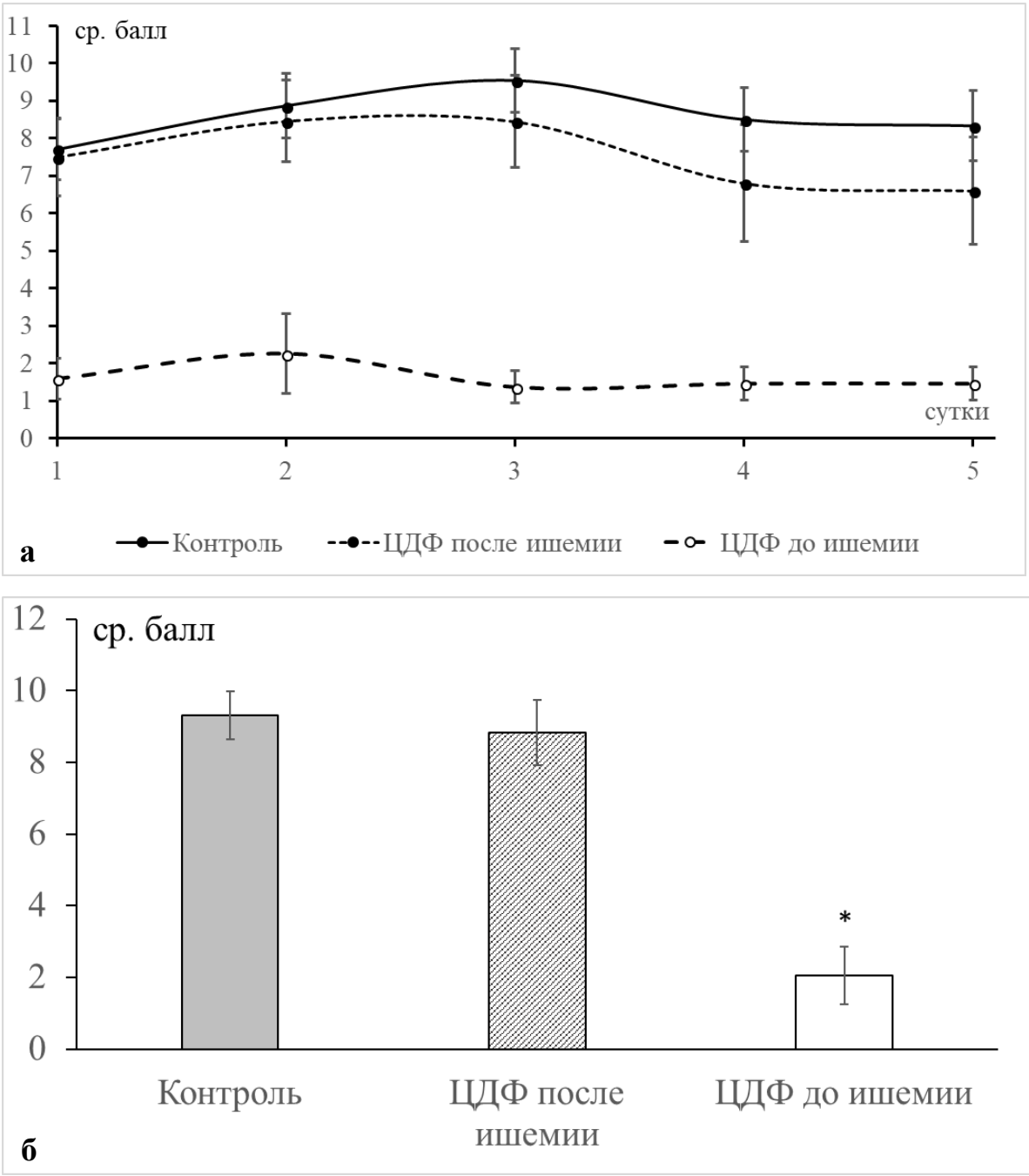


Рис. 3.3. *Динамика неврологического дефицита (а) и средний неврологический балл (б) по шкале оценки неврологических нарушений (McGraw C.P., 1977) с модификациями (Ohno K. et al., 1984) в течение первых 5 суток наблюдения после 60-минутной окклюзии левой СМА: обозначения см. на рис. 3.2.*

** P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами.*

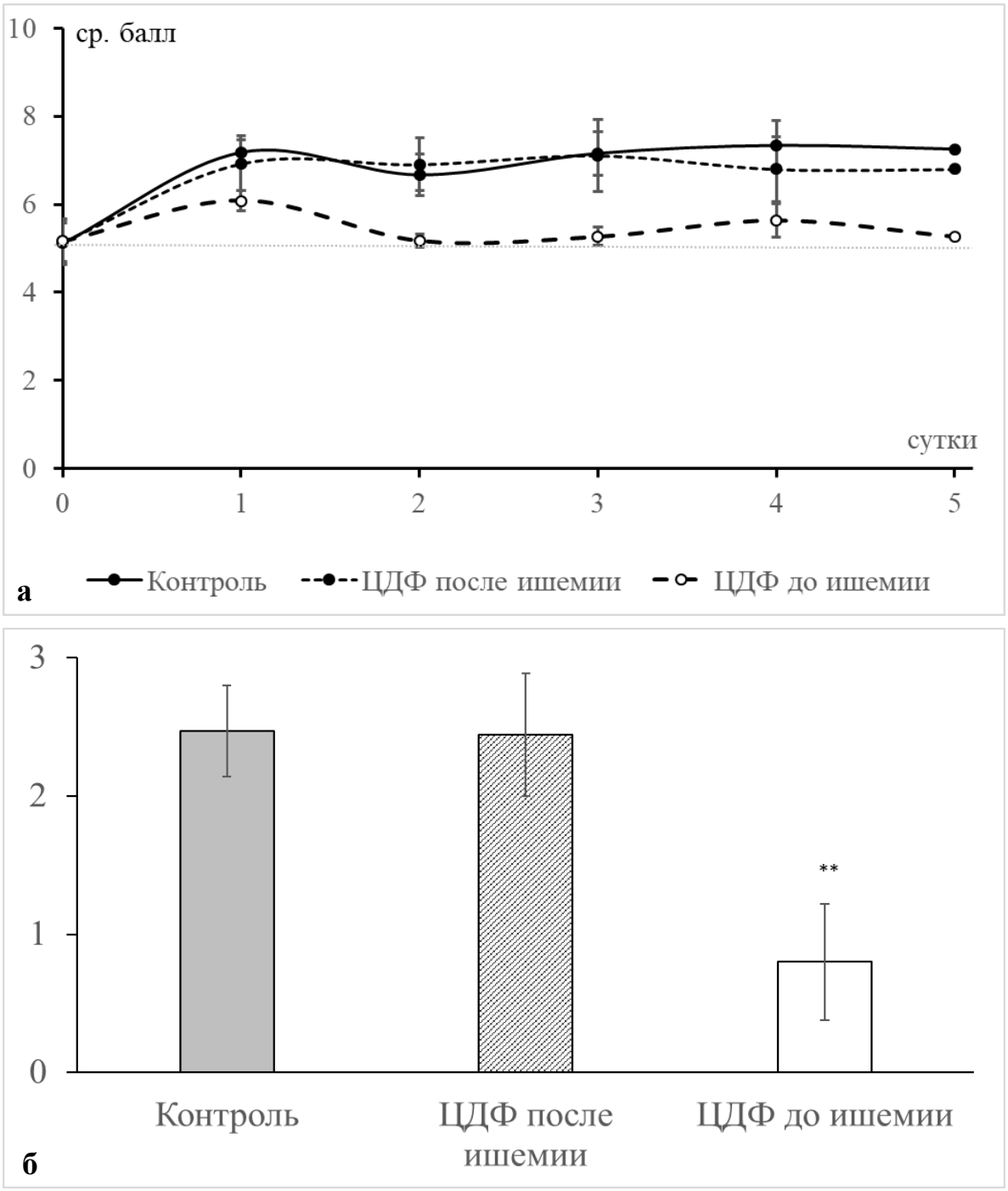


Рис. 3.4. *Неглект левой половины пространства (преобладание выбора правой половины пространства из 10 попыток) у крыс при проведении углового теста в первые 5 суток в динамике (а) и в среднем за все время наблюдения (б) после моделирования ишемии голоного мозга: обозначения см на рис. 3.2. * – P<0,05; ** –P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами.*

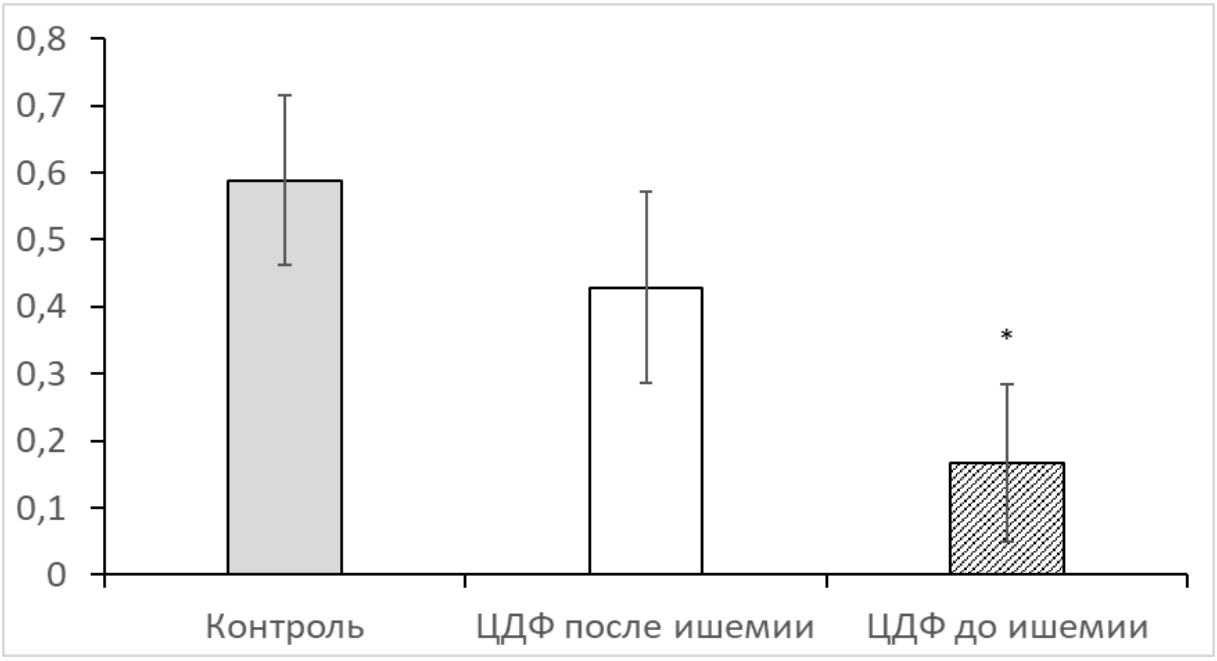


Рис. 3.5. *Летальность экспериментальных животных в первые 5 суток после моделирования ишемии голоного мозга: обозначения см. на рис. 3.2.*
** –P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами.*

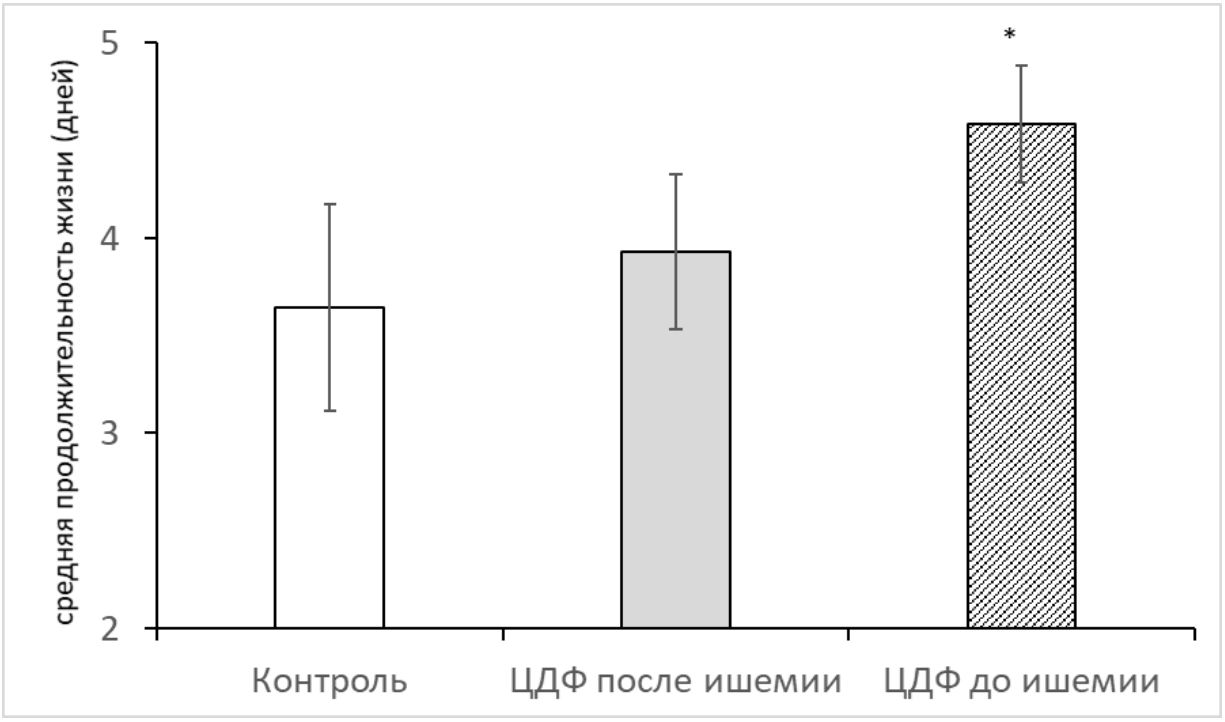


Рис. 3.6. *Средняя продолжительность жизни экспериментальных животных после моделирования ишемии голоного мозга с учетом вывода из эксперимента на 5 сутки: обозначения см. на рис. 3.2. * –P<0,05 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами.*

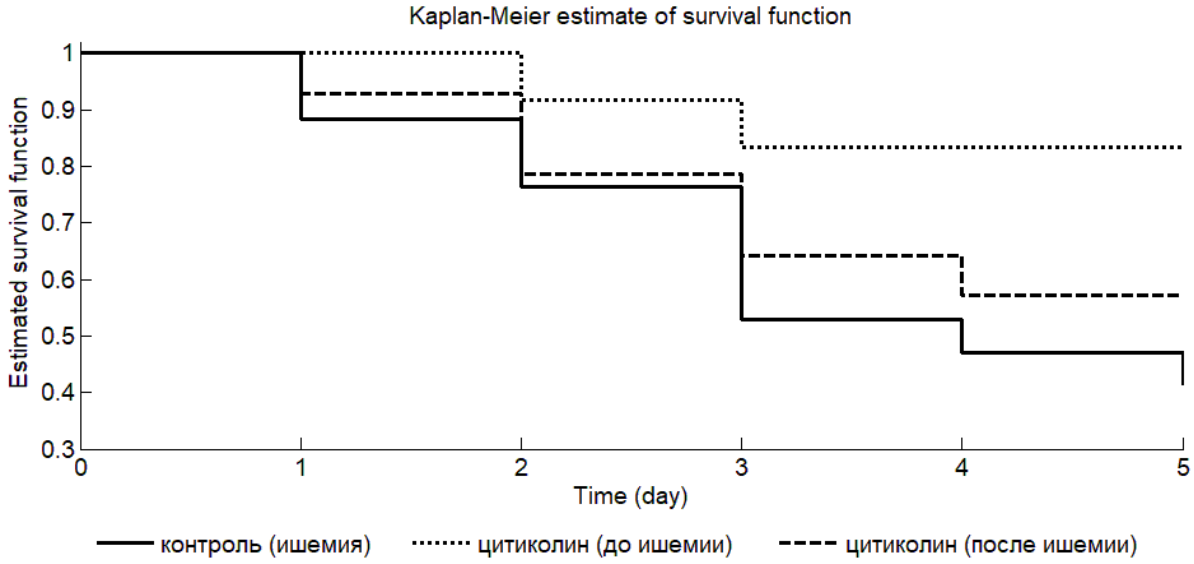


Рис. 3.7. *Кривая выживаемости Каплан-Мейера после моделирования ишемии голоного мозга: «контроль» - контрольная группа (моделирование ишемии головного мозга); «цитиколин (после ишемии)» - первая экспериментальная группа (моделирование ишемии головного мозга с последующим ежедневным лечебным в/б введением цитиколина); «цитиколин (до ишемии)» вторая экспериментальная группа (моделирование ишемии головного мозга на фоне профилактического в/б введения цитиколина).*

3.2. Гистопатологические нарушения при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс на фоне введения цитиколина

При гистологическом исследовании фронтальных срезов головного мозга у всех крыс контрольной и экспериментальных групп были выявлены характерные ишемические изменения нервной ткани во фронтопариетальных отделах коры и медиальных отделах хвостатого ядра и гиппокампе левой гемисферы, которые варьировали от гибели единичных нейронов до формирования крупноочаговых инфарктов. Качественные признаки повреждения были представлены типичными картинами дезорганизации нейрональных слоев, гомогенизацией и хроматолизом цитоплазмы, полиморфными изменениями ядер (набухание и пикноз), растворением глыбок базофильного вещества Ниссля и превращением в клетки-тени. Отмечалась распространенная нейрофагия, отек перицеллюлярного и периваскулярного пространств. В случаях формирования крупноочаговых инфарктов в зону некроза было вовлечено и белое вещество, при этом наиболее выраженные изменения как правило выявлялись в коре головного мозга. Наиболее выраженные гистопатологические нарушения обнаруживались у крыс контрольной группы (рис. 3.8-3.10). Гистопатологические изменения были выявлены у всех крыс данной группы и коррелировали с выраженностью неврологического дефицита. Суммарный гистопатологический балл у крыс контрольной группы составлял 6,3±0,9 (рис. 3.13). Наиболее высокая положительная корреляция гистопатологических нарушений была выявлена с показателями теста Бедерсона и шкалы McGraw, соответственно - 0,78 ($P<0,05$) и 0,76 ($P<0,05$). Корреляция с показателями углового теста составила 0,62 ($P<0,05$). Значимой корреляции с постишемической летальностью и продолжительностью жизни животных выявлено не было.

У крыс первой экспериментальной группы при ежедневном в/б введении цитиколина в постишемическом периоде отмечалась статистически не

значимая тенденция к умеренному снижению степени морфологического повреждения нервной ткани (рис.3.11). Как видно из рис. 3.13, суммарный гистопатологический балл у крыс данной группы составлял 5,7±1,6.

У крыс второй экспериментальной группы, при профилактическом применении цитиколина до моделирования ишемии головного мозга степень гистопатологических нарушений была существенно меньше, чем в контрольной и первой экспериментальной группах (рис. 3.12). Суммарный гистопатологический балл у крыс данной группы был примерно в 2,5 раза меньше, чем в контрольной серии и составлял 2,6±0,8 ($P<0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами) (рис.3.13).

Таким образом, транзиторная фокальная ишемия головного мозга, вызванная окклюзией левой СМА у крыс сопровождается выраженными распространенными ишемическими изменениями в коре и подкорковых структурах левого полушария головного мозга, профилактическое внутрибрюшинное введение цитиколина за 60 минут до моделирования ишемии головного мозга сопровождается значительным уменьшением выраженности морфологических нарушений. Лечебное ежедневное в/б введение цитиколина в первые 5 суток после моделирования ишемии головного мозга не сопровождается в раннем постишемическом периоде значимой положительной морфологической картиной повреждения нервной ткани.

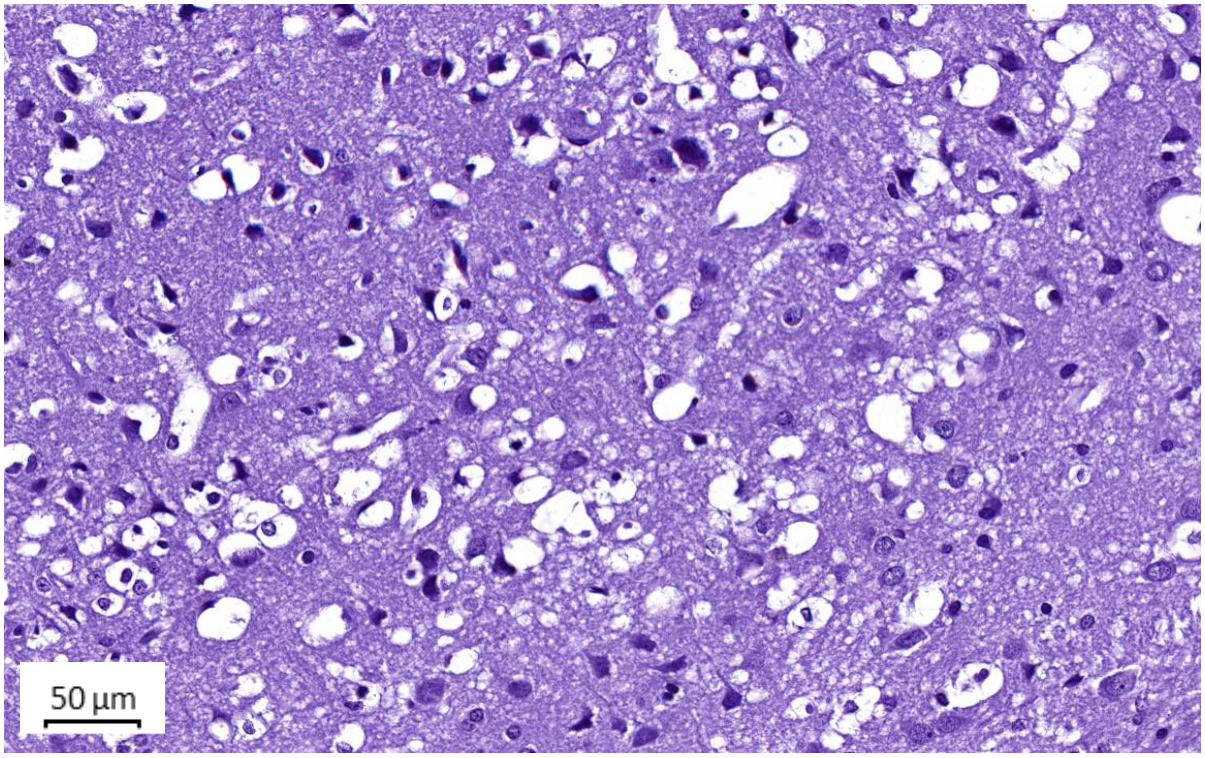


Рис. 3.8. *Гистологическая картина ишемических изменений в коре левого полушария головного мозга (области S1-S2) на 5 сутки после транзиторной внутрисосудистой окклюзии левой ВСА у крыс контрольной группы. Окраска гематоксилин-эозином. Масштаб указан на микрофотографии.*

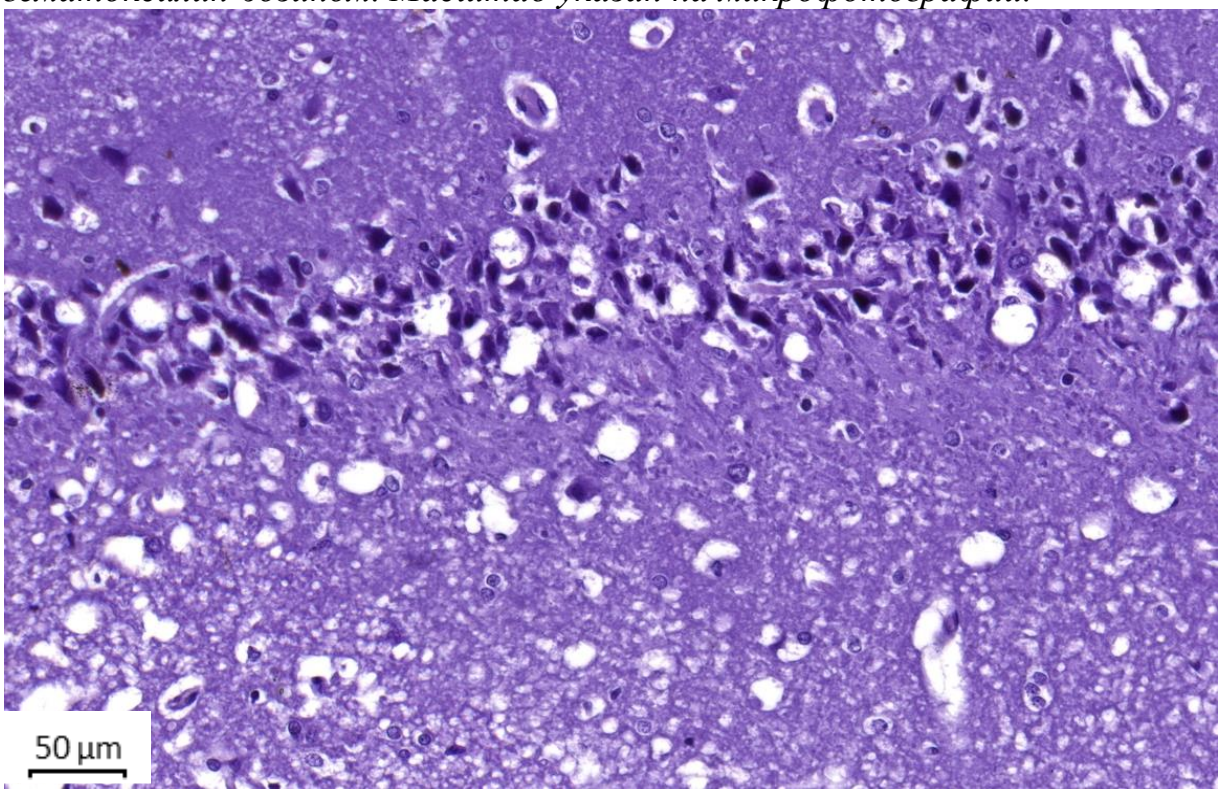


Рис. 3.9. *Гистологическая картина ишемических изменений в области СА1 гиппокампа слева на 5 сутки после транзиторной внутрисосудистой окклюзии левой ВСА у крыс контрольной группы. Окраска гематоксилин-эозином. Масштаб указан на микрофотографии.*

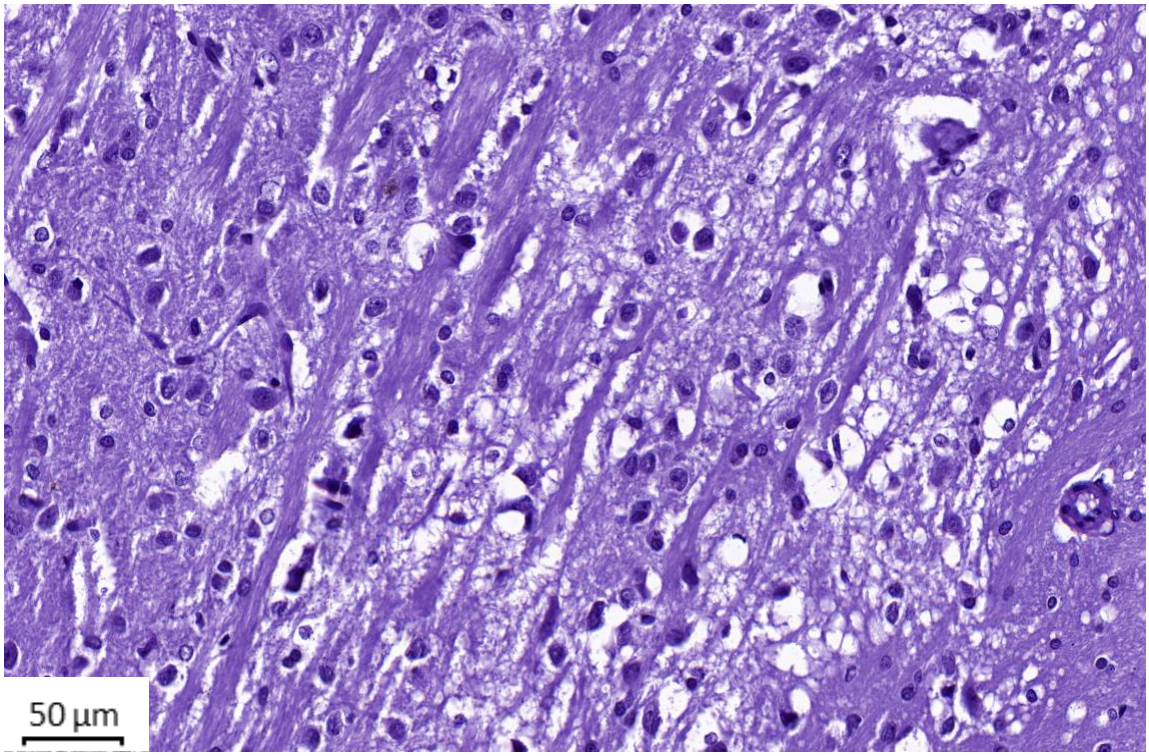


Рис. 3.10. *Гистологическая картина ишемических изменений в базальных ганглиях левого полушария на 5 сутки после транзиторной внутрисосудистой окклюзии левой ВСА у крыс контрольной группы. Окраска гематоксилин-эозином. Масштаб указан на микрофотографии.*

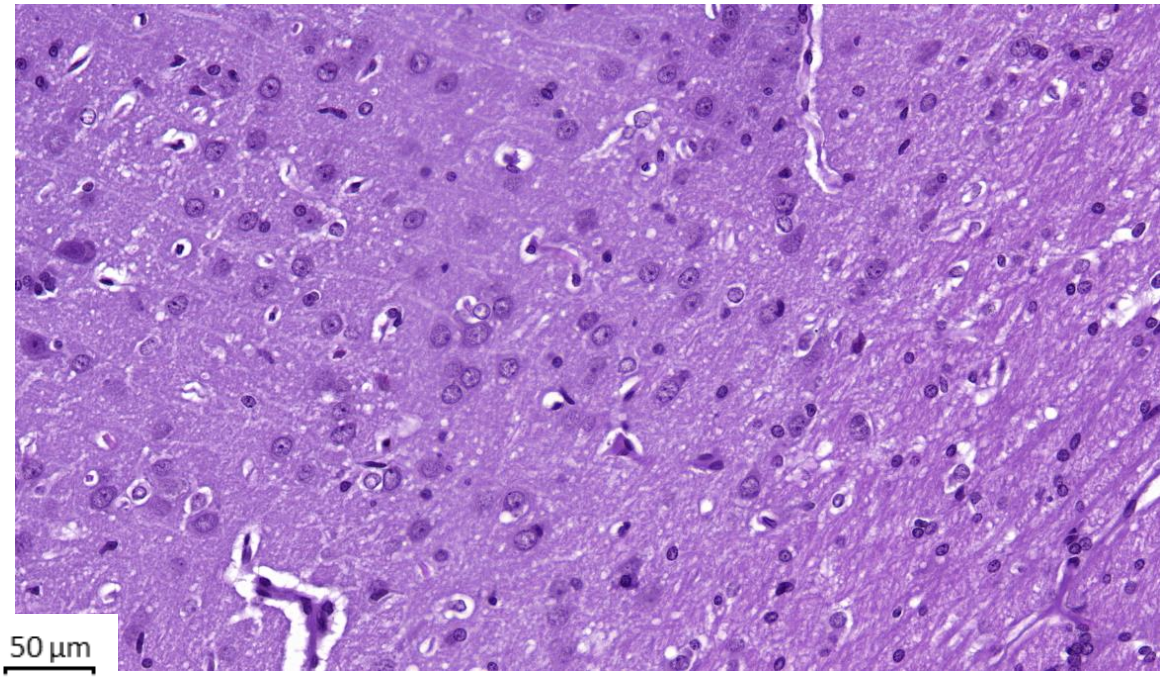


Рис. 3.11. *Гистологическая картина ишемических изменений в коре левого полушария головного мозга (области S1-S2) на 5 сутки после транзиторной внутрисосудистой окклюзии левой ВСА у крыс первой экспериментальной группы (ежедневное в/б введение цитиколина в постишемическом периоде). Окраска гематоксилин-эозином. Масштаб указан на микрофотографии.*

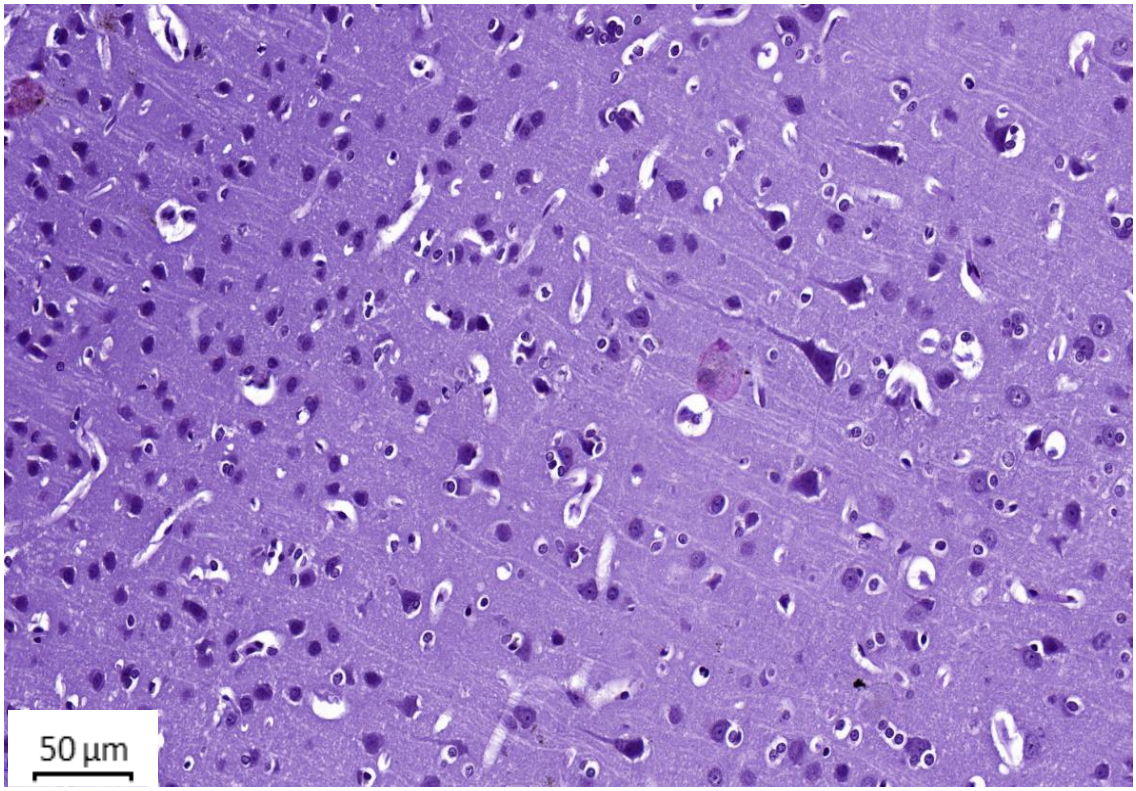
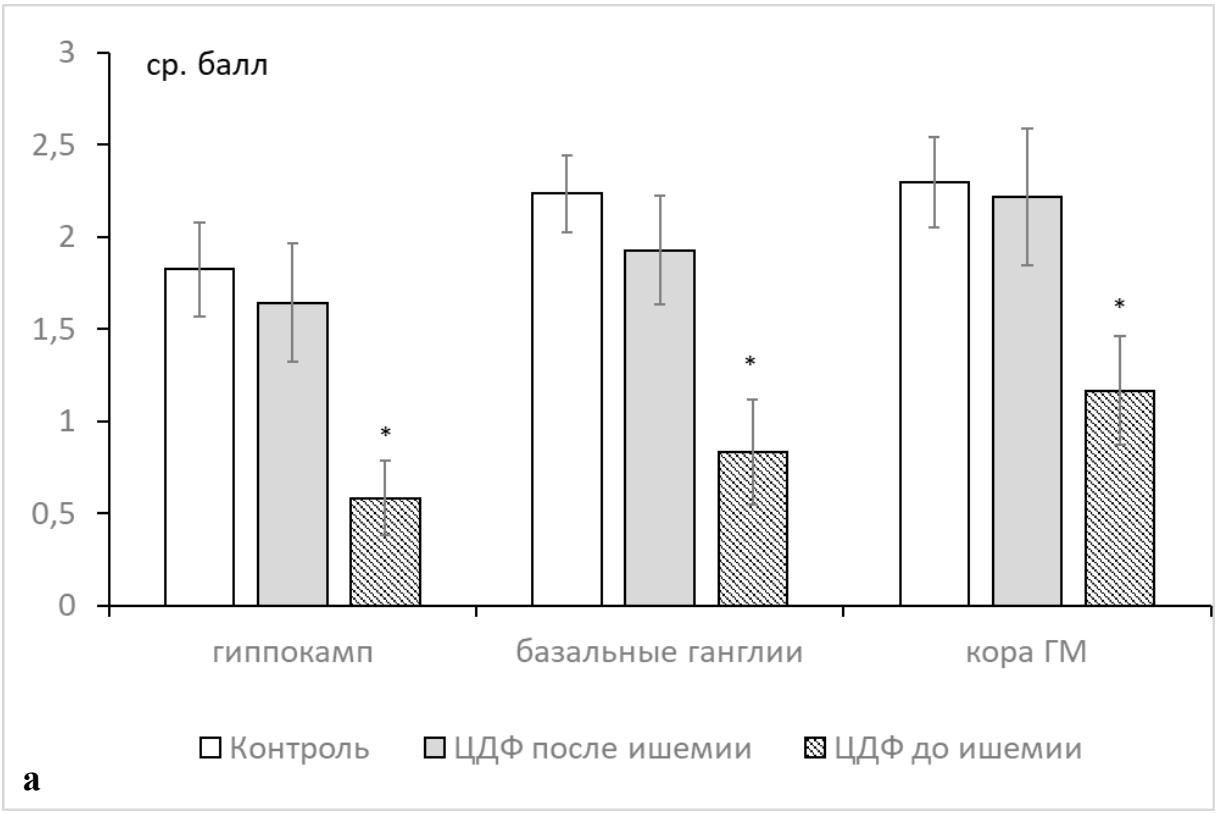


Рис. 3.12. *Гистологическая картина ишемических изменений в коре левого полушария головного мозга (области S1-S2) на 5 сутки после транзиторной внутрисосудистой окклюзии левой ВСА у крыс второй экспериментальной группы (моделирование ишемии на фоне профилактического в/б введения цитиколина). Окраска гематоксилин-эозином. Масштаб указан на микрофотографии.*



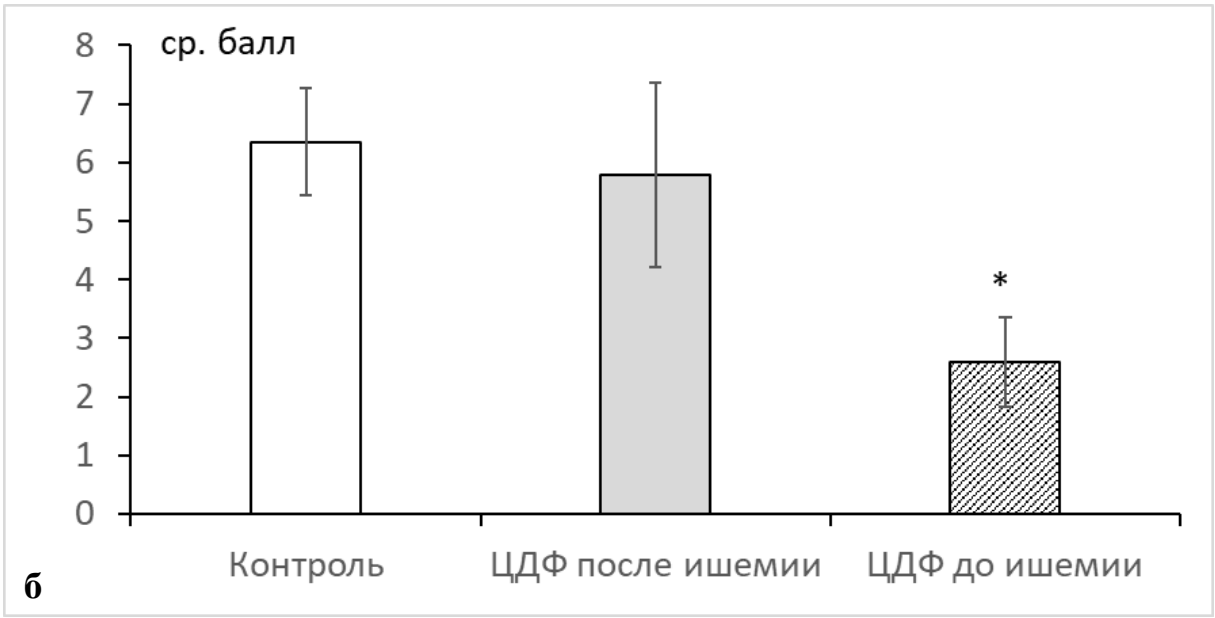


Рис. 3.13. *Степень гистопатологических нарушений в различных отделах головного мозга крыс (а) и суммарная оценка (б) повреждения головного мозга у крыс при моделировании транзиторной 60 минутной фокальной ишемии головного мозга: «Контроль» - контрольная группа (моделирование ишемии головного мозга); «ЦДФ после ишемии» - первая экспериментальная группа (моделирование ишемии головного мозга с последующим ежедневным лечебным в/б введением цитиколина); «ЦДФ до ишемии» (моделирование ишемии головного мозга на фоне профилактического в/б введения цитиколина). * –P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами.*

3.3. Концентрация нейроспецифических белков NSE и S100b в плазме крови при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс на фоне введения цитиколина

Как видно из рисунков 3.14 и 3.15 у всех крыс ложнооперированной серии в течение первых 5 суток не отмечалось статистически значимых изменений концентрации нейроспецифических белков NSE и S100b в плазме крови. Колебания уровней нейроспецифических белков в различные дни после операции в этой группе не превышали 10-15%. При моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга путем 60 минутной интравазальной окклюзии левой ВСА у всех животных контрольной группы в первые сутки отмечалось значительное возрастание уровня нейроспецифической енолазы до 232,2±8,1% от исходного уровня ($P<0,01$ в сравнении с доишемическим уровнем) с последующей тенденцией к незначительному снижению до 194,5±10,4% от исходного уровня ($P<0,01$ в сравнении с исходным доишемическим уровнем и 1 сутками после моделирования ишемии) (рис. 3.14). Повышение концентрации белка S100 в плазме крови в контрольной группе были более существенны - до 308,9±8,6% от исходного значения ($P<0,01$ в сравнении с исходным доишемическим уровнем) (рис. 3.15). На 3 и 5 сутки также отмечалась тенденция к постепенному снижению сывороточной концентрации данного белка до 270,1±13,2% от исходного уровня ($P<0,01$ в сравнении с исходным уровнем, $P<0,05$ в сравнении с 1 сутками после моделирования ишемии). Статистической разницы между изменениями на 1 и 3 сутки не отмечалось, несмотря на тенденцию к некоторому снижению концентраций белков в эти периоды. Значимой корреляции между уровнями нейроспецифических белков в плазме крови и выраженностью гистопатологических и неврологических нарушений мы не выявили Коэффициенты корреляции сывороточных концентраций NSE и S100b с гистопатологическими нарушениями составили соответственно 0,13 и 0,22; вариабельность коэффициентов корреляции для неврологических тестов находилась в пределах 25-40%. Отмечалась средняя взаимосвязь между

максимальными уровнями нейроспецифических белков в плазме крови в 1-3 сутки после моделирования ишемии и летальностью экспериментальных животных контрольной группы. Коэффициенты корреляции для NSE и S100b с этим параметром составили соответственно 0,48 (P<0,05) и 0,57 (P<0,05).

Статистической разницы в динамике изменений концентраций нейроспецифических белков в первой экспериментальной группе (при ежедневном назначении цитиколина в постишемическом периоде) в первые 5 суток постишемического периода в сравнении с контрольной группой выявлено не было. Концентрация NSE, аналогично контрольной группе, в первые сутки после ишемии увеличилась до 228,9±6,6% от исходного уровня (P<0,01 в сравнении с исходным доишемическим уровнем) с постепенным статистически значимым снижением до 188,2±7,5% от исходного уровня к 5 суткам после ишемии (P<0,01 в сравнении с исходным уровнем, P<0,05 в сравнении с 1 сутками после моделирования ишемии) (рис. 3.14). Увеличение сывороточной концентрации S100b в этой группе составило в 1 сутки составило 306,7±13,9% от исходного уровня (P<0,01). К 5 суткам в первой экспериментальной группе концентрация этого белка снизилась до 260,2±13,4% от исходного уровня (P<0,01 в сравнении с исходным уровнем, P<0,05 в сравнении с 1 сутками после моделирования ишемии) (рис. 3.15)

Динамика изменения концентрации NSE у крыс второй экспериментальной группы (моделирование ишемии головного мозга на фоне профилактического введения цитиколина) характеризовалась максимальным уровнем только на 3 сутки после окклюзии левой СМА, когда концентрация этого белка превысила исходное доишемическое значение на 93,4±5,6% (P<0,01 в сравнении с исходным уровнем и 1 сутками после моделирования ишемии; P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами). На 5 сутки отмечалось статистически значимое снижение концентрации данного белка в сыворотке крови до 147,9±4,0% (P<0,01 в сравнении с исходным уровнем и 3 сутками после моделирования ишемии; P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами)

(рис. 3.14). Изменения концентрации белка S100b была подобна изменениям в контрольной группе с максимальным уровнем на 1 сутки после моделирования ишемии головного мозга (рис. 3.15). Концентрации этого белка в плазме крови в первые сутки во второй экспериментальной группе составила 253,4±13,9% ($P<0,01$ в сравнении с исходным уровнем, $P<0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами). На 5 сутки отмечалось снижение концентрации S100b до 216,0±11,3% от исходного уровня ($P<0,01$ в сравнении с исходным уровнем, $P<0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами).

Таким образом, профилактическое введение цитиколина сопровождается менее значительным увеличением концентрации нейроспецифических белков плазмы крови, что свидетельствует о меньшей степени повреждения структур головного мозга и ГЭБ при моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга. Назначение цитиколина с лечебной целью в первые 5 суток не сопровождается значимыми изменениями концентрации нейроспецифических белков плазмы крови.

Таблица 3.1.

Концентрация нейроспецифических белков S100 (нг/л) и NSE(мкг/л) в плазме крови на 1,3 и 5 сутки после моделирования фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс

	До ишемии	1 сутки	3 сутки	5 сутки
Концентрация белка S100b (нг/л)				
Ложнооперированная группа	88,74±7,33	101,30±5,74	92,92±8,72	90,21±9,33
Контроль	89,81±6,96	277,49±7,78 *	275,71±8,05 *	242,51±11,86 * &
Цитиколин после ишемии	87,13±7,61	268,03±10,11 *	254,81±15,43 *	226,75±11,68 * &
Цитиколин до ишемии	88,33±5,47	223,80±12,30 * #	209,20±7,64 * #	190,81±10,00 * # &
Концентрация NSE (мкг/л)				
Ложнооперированная группа	8,31±0,49	8,91±0,42	8,66±0,40	8,28±0,38
Контроль	8,26±0,53	19,19±0,66 *	18,74±0,75 *	16,07±0,87 * &
Цитиколин после ишемии	8,49±0,64	19,43±0,56 *	17,94±0,83 *	15,97±0,64 * &
Цитиколин до ишемии	8,34±0,57	11,61±0,31 * #	16,13±0,47 * ##	12,34±0,34 * # &

Примечание: *«Ложнооперированная группа» –ложнооперированная группа (оперативное вмешательство без окклюзии брахицефальных сосудов) ; «Контроль» –контрольная группа (моделирование транзиторной внутрисосудистой окклюзии левой СМА); «цитиколин после ишемии» первая экспериментальная группа (ежедневное в/б введение цитиколина в первые 5 суток после моделирования ишемии головного мозга) ; «цитиколин до ишемии» вторая экспериментальная группа (профилактическое в/б введение цитиколина за 60 минут до моделирования ишемии головного мозга).* - P<0,01 в сравнении с исходным уровнем; # - P<0,01, ## - P<0,05 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами; & - P<0,05 в сравнении с максимальным уровнем концентрации NSE (1 сутки для контрольной и первой экспериментальной групп, 3 сутки для второй экспериментальной группы).*

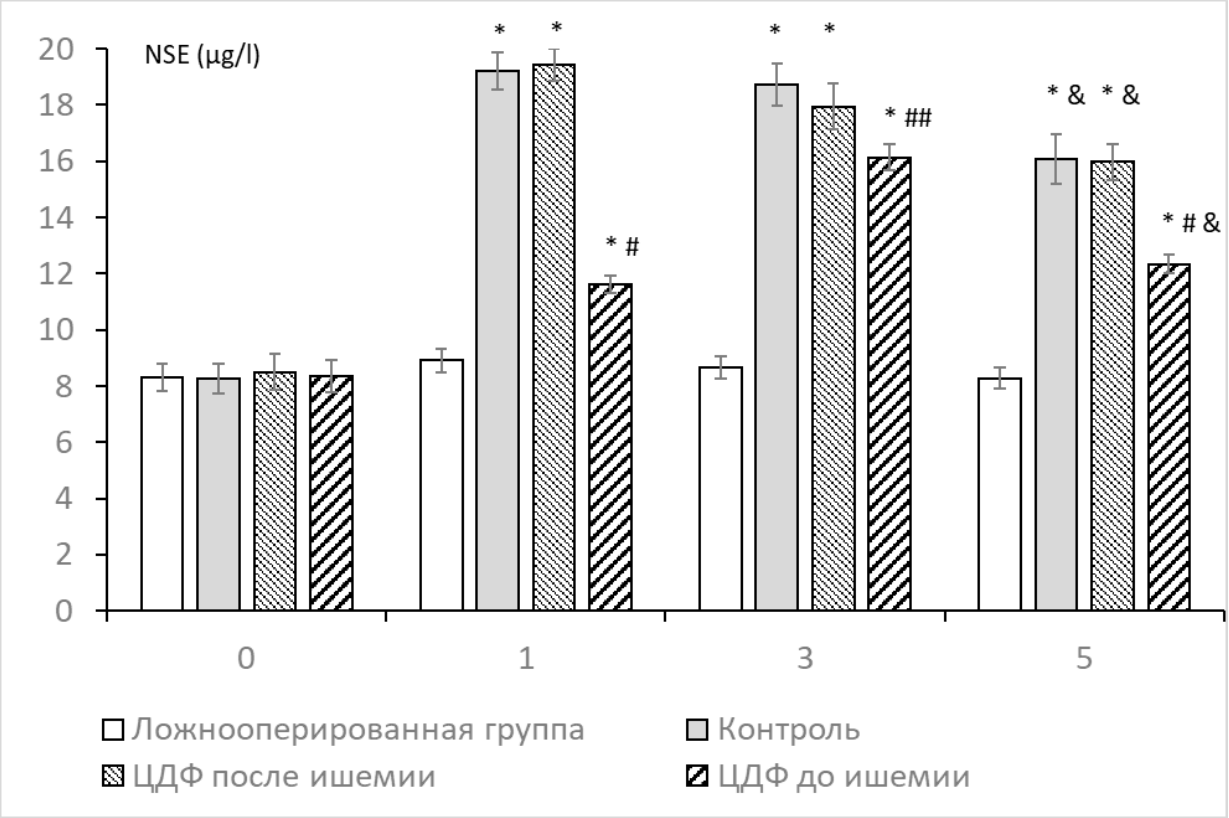


Рис. 3.14. *Концентрация нейроспецифической енолазы (NSE, мкг/л) в плазме крови при моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга у крыс: «Ложнооперированная группа» – ложнооперированная группа (оперативное вмешательство без окклюзии брахицефальных сосудов) ; «Контроль» – контрольная группа (моделирование транзиторной внутрисосудистой окклюзии левой СМА); «ЦДФ после ишемии» первая экспериментальная группа (ежедневное в/б введение цитиколина в первые 5 суток после моделирования ишемии головного мозга); «ЦДФ до ишемии» вторая экспериментальная группа (профилактическое в/б введение цитиколина за 60 минут до моделирования ишемии головного мозга).* - P<0,01 в сравнении с исходным уровнем; # - P<0,01, ## - P<0,05 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами; & - P<0,05 в сравнении с максимальным уровнем концентрации NSE (1 сутки для контрольной и первой экспериментальной групп, 3 сутки для второй экспериментальной группы).*

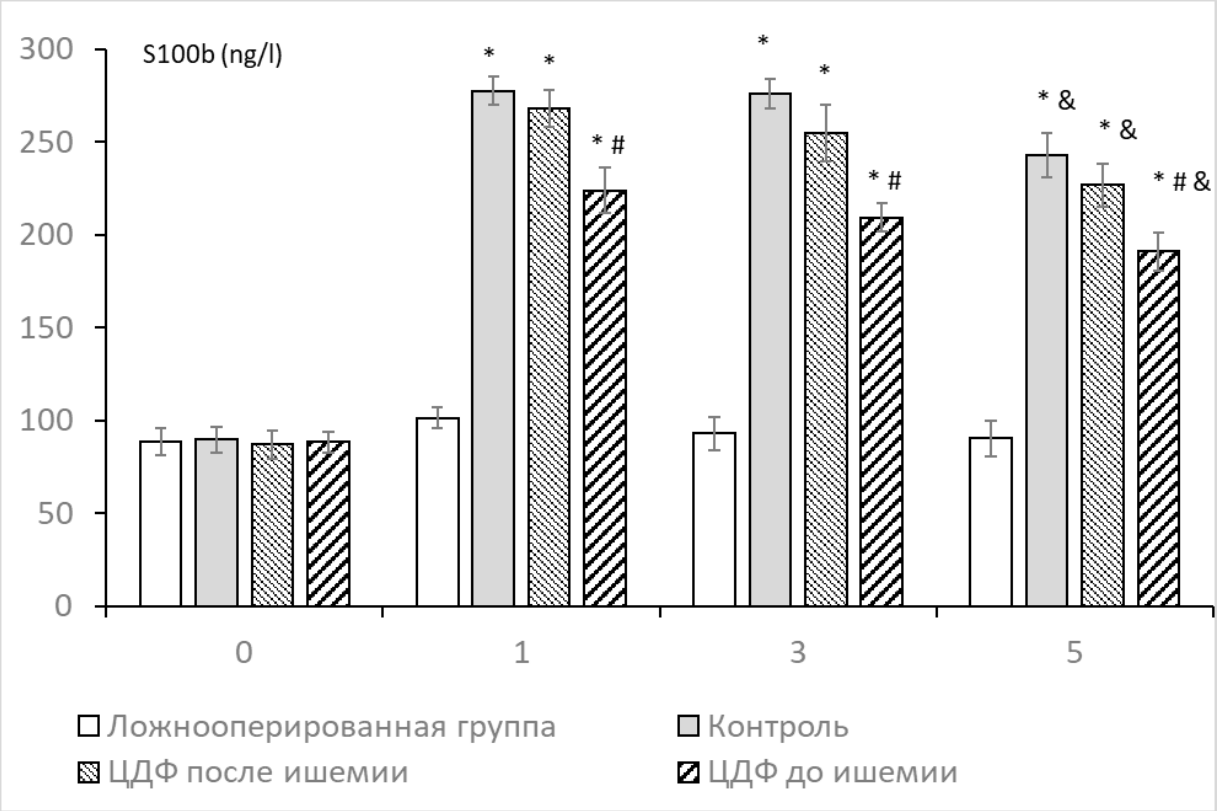


Рис. 3.15. *Концентрация белка S100b (нг/л) в плазме крови при моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга у крыс: «Ложнооперированная группа» – ложнооперированная группа (оперативное вмешательство без окклюзии брахицефальных сосудов) ; «Контроль» – контрольная группа (моделирование транзиторной внутрисосудистой окклюзии левой СМА); «ЦДФ после ишемии» первая экспериментальная группа (ежедневное в/б введение цитиколина в первые 5 суток после моделирования ишемии головного мозга); «ЦДФ до ишемии» вторая экспериментальная группа (профилактическое в/б введение цитиколина за 60 минут до моделирования ишемии головного мозга).* - P<0,01 в сравнении с исходным уровнем; # - P<0,01 в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами; & - P<0,05 в сравнении с максимальным уровнем концентрации S100b (1 сутки) после моделирования ишемии головного мозга.*

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТИКОЛИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЛОБАЛЬНОЙ СТРАНГУЛЯЦИОННОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У МЫШЕЙ

4.1. Изменения продолжительности гаспинга, локального мозгового кровотока, уровня постоянного потенциала и электроэнцефалограммы при моделировании глобальной ишемии головного мозга у мышей

Моделирование глобальной странгуляционной ишемии головного мозга по методике, представленной в нашем исследовании, сопровождалось быстрым, в течении 0,64 секунд, снижением локального мозгового кровотока у мышей до 6,21±0,23% от исходного уровня (рис. 4.1), что объясняется острым механическим нарушением кровообращения по всем сосудистым бассейнам. Аналогичная степень и скорость угнетения мозгового кровотока отмечалась во всех исследуемых группах. Статистических различий и особенностей изменений этого параметра между группами выявлено не было, что объясняется исключительно механическим воздействием на кровообращение головного мозга. Снижение кровотока также сопровождалось выраженной депрессией суммарной амплитуды ЭЭГ (рис.4.2) и негативными сдвигами УПП (рис. 4.3).

В момент прекращения агональных дыхательных движений у большинства мышей наблюдалось появление в записи ЭЭГ характерного артефакта в виде однофазной или двухфазной волны продолжительностью до 1-2 секунд и амплитудой от 100 мкВ до 1 мВ (рис. 4.3).

При моделировании ишемии у мышей контрольной группы в среднем через 19,7±2,1 секунд с момента странгуляции наблюдалось развитие агонального дыхания (гаспинга), средняя продолжительность которого составляла 68,6±7,8 секунд от начала ишемии (рис. 4.4).

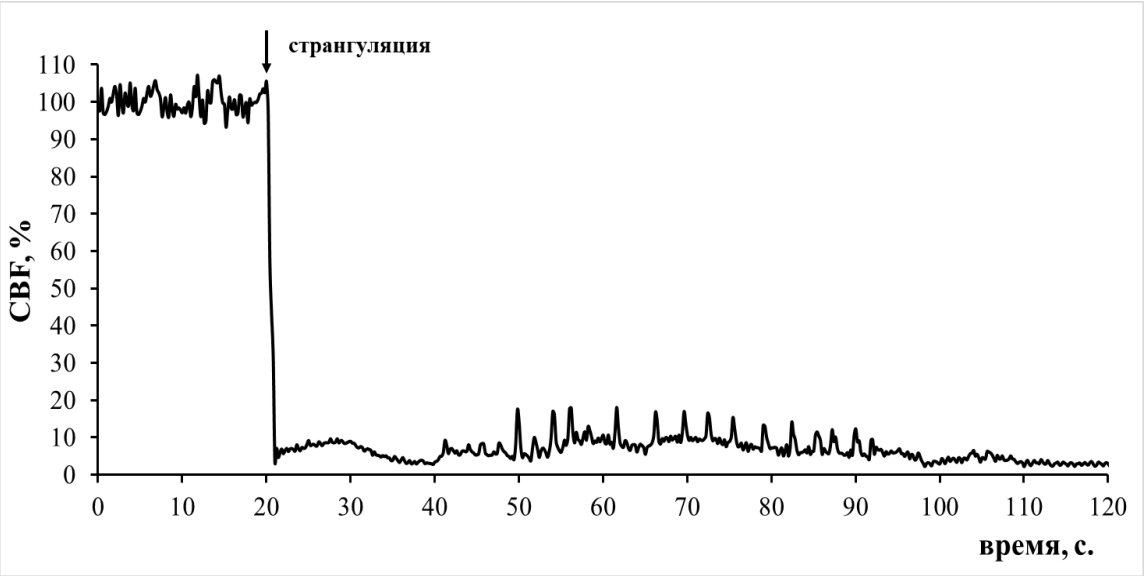


Рис.4.1. *Изменение локального мозгового кровотока (CBF) в больших полушариях мозга мышей при моделировании глобальной странгуляционной ишемии. Стрелкой указан момент странгуляции, с 20 секунды после начала ишемии наблюдаются двигательные артефакты, вызванные агональным дыханием (гаспинг).*

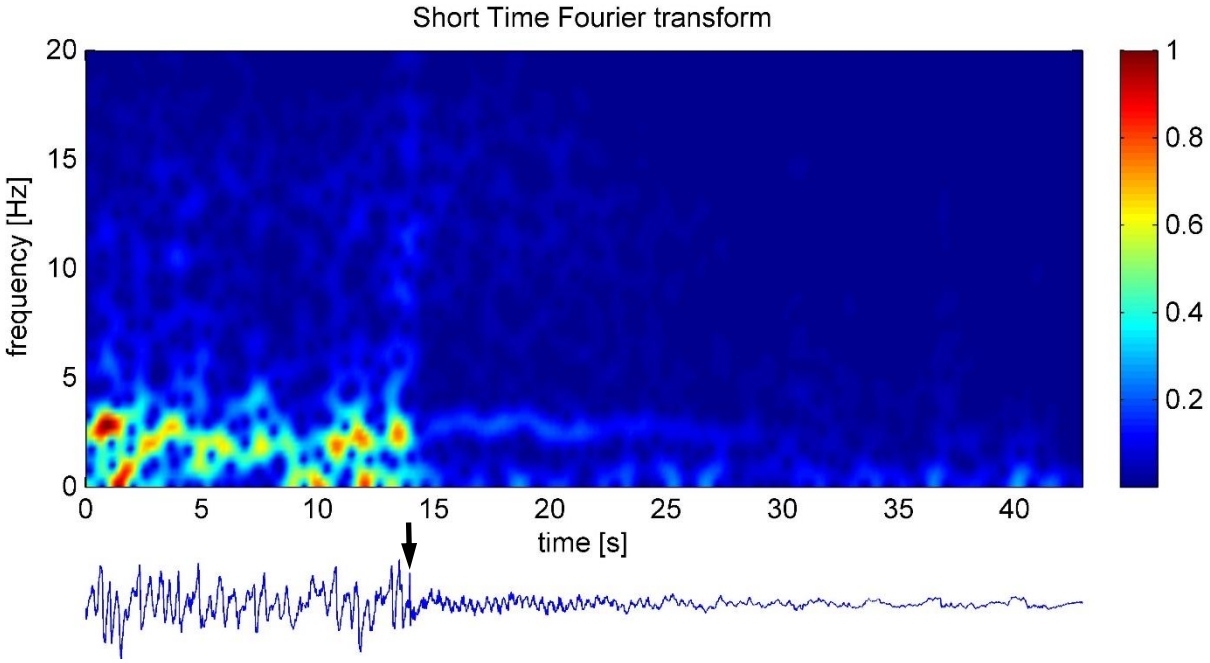


Рис. 4.2. *Частотно-временной анализ ЭЭГ мыши при моделировании странгуляционной ишемии головного мозга. Контрольная группа, амплитуда ЭЭГ нормирована. Стрелкой указан момент странгуляции*

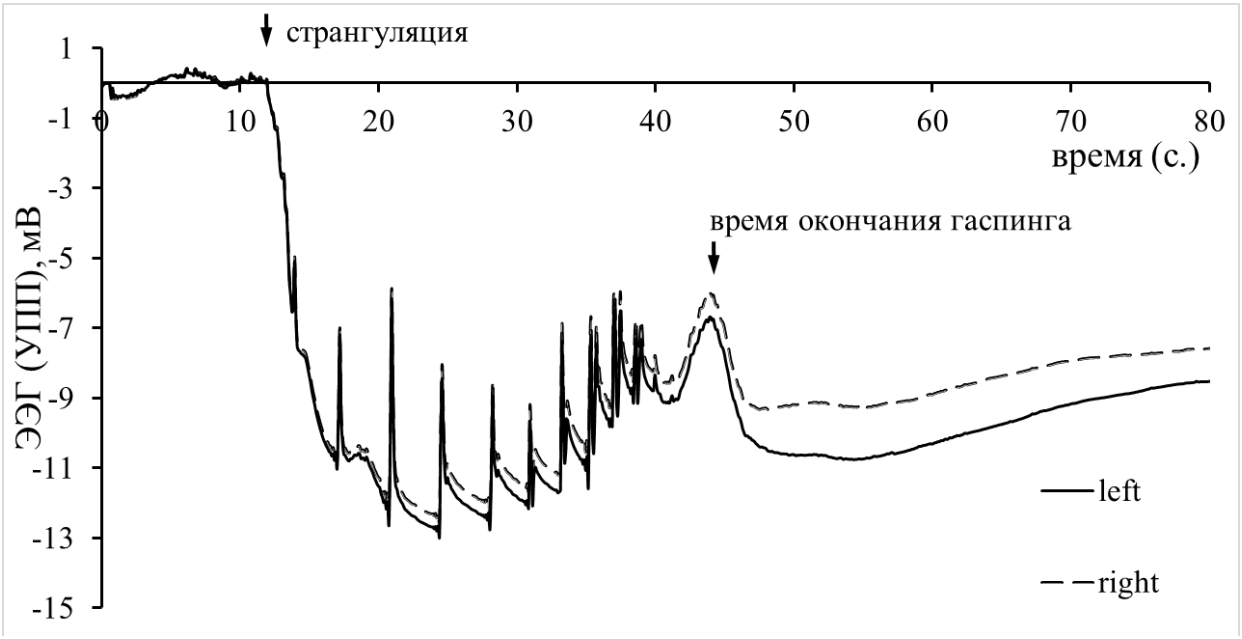


Рис.4.3. *Пример записи ЭЭГ мыши с теменных отведений при моделировании глобальной странгуляционной ишемии головного мозга. Стрелками указан момент начала ишемии (странгуляция) и окончания гаспинга. Видно появление в записи ЭЭГ характерного артефакта в виде однофазной волны при прекращении агонального дыхания.*

Максимальная амплитуда электроотрицательных сдвигов постоянного потенциала (до 14,2±0,4 мВ) (рис. 4.6) и практически полное угнетение суммарной амплитуды ЭЭГ в данной группе животных регистрировались в среднем через 17,7±1,8 секунд после начала ишемии (рис. 4.5). Была выявлена средняя корреляция между временем тотальной депрессии электрофизиологических параметров и продолжительностью гаспинга ($r=0,57$ $P<0,05$). В первые 10 секунд моделирования ишемии суммарная амплитуда ЭЭГ снизилась на 48,7±5,6% – с 66,3±3,4 мкВ до 33,9±3,8 мкВ ($P<0,001$ в сравнении с исходным уровнем) (рис. 4.7, таблица 4.1). Через 10-30 секунд исследования суммарная амплитуда уменьшилась на 79,2±3,4% от исходной и составила 13,7±2,3 мкВ. Максимальная депрессия мощности регистрировалась также в дельта и тета диапазонах, где снижение амплитуды составило 78,9±3,1% и 82,5±3,6%. Амплитуды альфа и бета диапазонов уменьшились соответственно на 65,2±4,7% и 69,3±7,2%. Через 30 секунд после

начала ишемии амплитуда ЭЭГ не превышала фонового шума и составляла 3,8±0,1 мкВ.

Таким образом, глобальная ишемия головного мозга, вызванная странгуляцией, сопровождается быстрым снижением локального мозгового кровотока у мышей и альтерацией спонтанной биоэлектрической активности коры головного мозга в виде негативизации УПП, отражающего развитие ишемической деполяризации, и депрессии амплитуды электроэнцефалограммы, указывающей на угнетение функциональной активности коры головного мозга на фоне ишемии. Одновременная регистрация УПП и ЭЭГ позволяет объективизировать оценку выраженности повреждения нервной ткани и может использоваться для верификации динамики развития ишемических изменений нервной ткани в качестве объективного маркера, позволяющего проводить сравнительную оценку потенциальных нейропротективных свойств новых лекарственных препаратов.

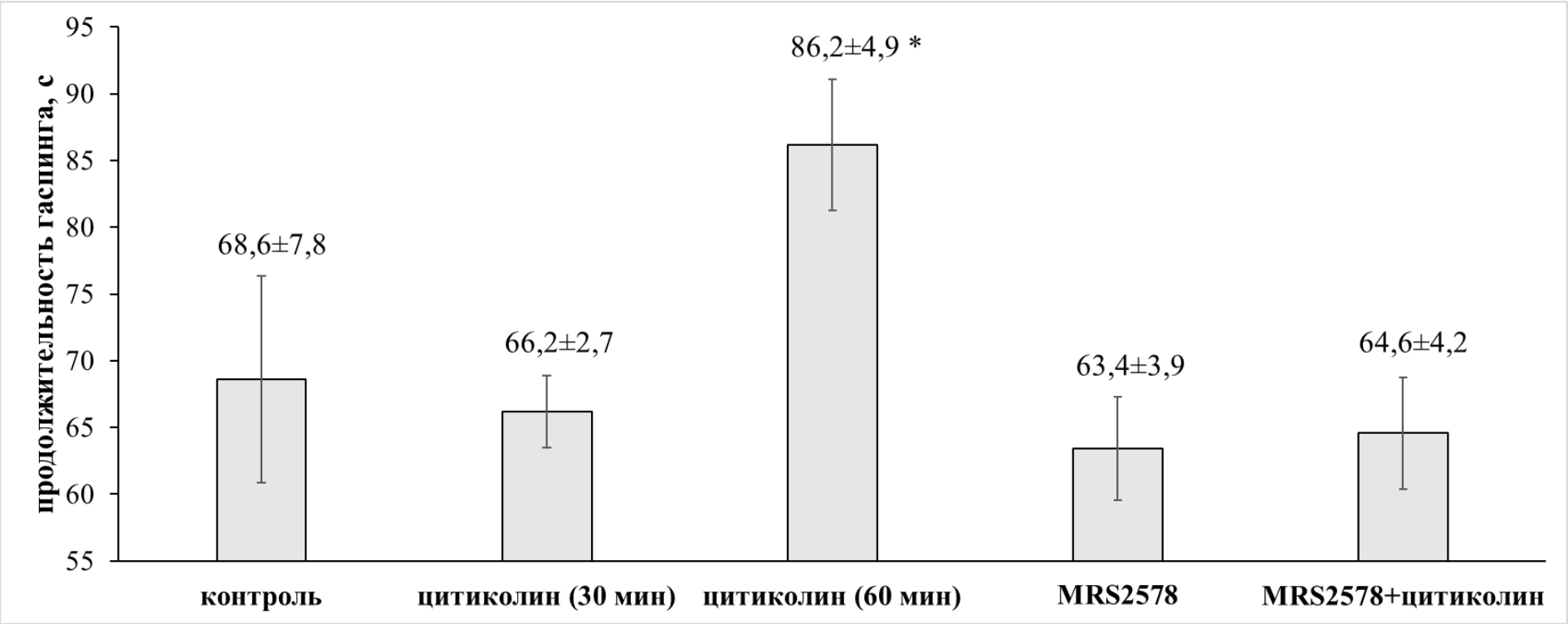


Рис. 4.4. *Продолжительность агонального дыхания (гаспинга) в различных экспериментальных группах при моделировании глобальной странгуляционной ишемии головного мозга: «контроль» - первая (контрольная) группа; «цитиколин (30 мин)» - вторая группа (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 30 минут до ишемии); «цитиколин (60 мин)» - третья группа (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до ишемии); «MRS2578» - 4 группа (введение MRS2578 (25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. до моделирования ишемии); «MRS2578+цитиколин» - 5 группа (введение MRS2578 (25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. и цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до моделирования ишемии). * - P<0,05 в сравнении с другими группами.*

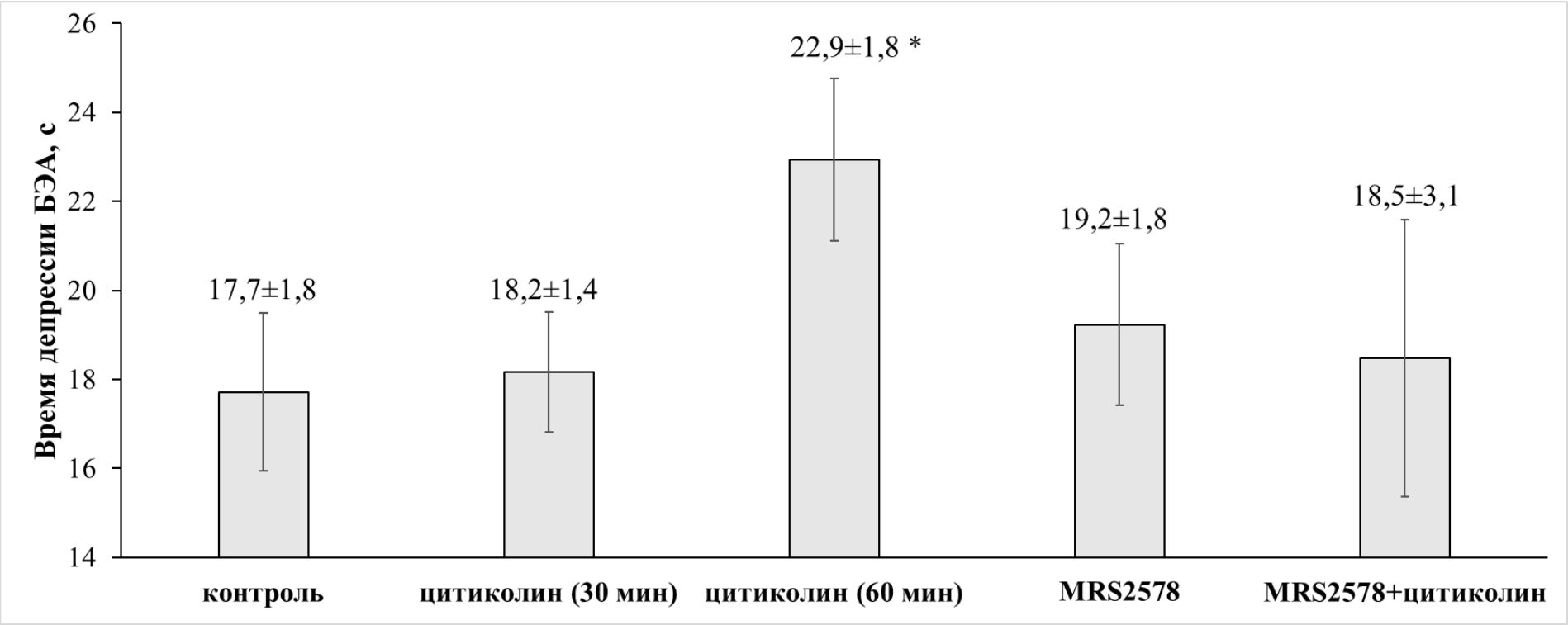


Рис. 4.5. *Среднее время полного угнетения спонтанной биоэлектрической активности головного мозга (БЭА) в различных экспериментальных группах при моделировании глобальной странгуляционной ишемии головного мозга: «контроль» - первая (контрольная) группа; «цитиколин (30 мин)» - вторая группа (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 30 минут до ишемии); «цитиколин (60 мин)» - третья группа (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до ишемии); «MRS2578» - 4 группа (введение MRS2578 (25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. до моделирования ишемии); «MRS2578+цитиколин» - 5 группа (введение MRS2578 (25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. и цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до моделирования ишемии). * - P<0,05 в сравнении с другими группами.*

Таблица 4.1.

Амплитуда отдельных частотных диапазонов ЭЭГ (мкВ) и УПП (мВ) в разные периоды моделирования глобальной ишемии головного мозга у мышей

Период ишемии	Дельта (0.5-3 Гц)	Тета (3-7 Гц)	Альфа (7-12 Гц)	Бета (12-20 Гц)	Суммарная амплитуда	УПП (мВ)
1 (контрольная) группа						
до ишемии	192,6±4,1	52,2±1,3	13,2±0,3	7,0±0,2	66,3±3,4	0,0±0,9
0-10 с	114,2±12,2	39,5±2,4	8,4±0,5	5,2±0,4	33,9±3,8	-9,9±1,9
10-30 с	40,5±6,0	9,1±1,9	4,6±0,6	2,1±0,5	13,7±2,3	-13,3±2,4
> 30 с	10,8±0,4	3,1±0,1	0,9±0,1	0,4±0,1	3,8±0,1	-14,2±0,4
2 группа (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 30 минут до ишемии)						
до ишемии	191,0±7,5	48,7±2,7	13,5±0,8	5,98±0,4	64,8±3,5	0,0±0,3
0-10 с	112,9±8,4	36,9±1,6	9,2±0,9	4,02±0,6	40,8±2,7	-9,9±2,3
10-30 с	42,7±5,9	9,7±1,9	2,9±0,4	1,03±0,5	14,1±2,1	-13,3±2,4
> 30 с	10,9±0,6	3,1±0,1	1,1±0,1	0,43±0,1	3,9±0,2	-14,7±0,5
3 группа (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до ишемии)						
до ишемии	189,3±3,95	45,6±1,0	14,9±0,5	6,9±0,2	64,2±1,38	0,0±1,1
0-10 с	117,9±9,63	30,6±2,4	8,9±0,5	4,3±0,3	40,5±2,98	-8,5±1,7
10-30 с	56,8±5,98	9,3±1,6	3,3±0,4	1,2±0,2	17,7±3,02	-12,8±2,3
> 30 с	10,7±1,06	3,7±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	3,6±0,32	-13,0±0,4
4 группа (введение MRS2578 (25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. до моделирования ишемии)						
до ишемии	193,4±5,8	49,0±2,1	13,5±0,2	6,3±0,1	65,4±1,39	0,0±0,3
0-10 с	102,7±11,2	37,8±4,3	9,2±1,1	4,1±0,6	38,5±6,64	-10,6±2,1
10-30 с	35,0±6,1	8,8±1,9	2,4±0,4	0,1±0,1	11,8±2,11	-14,5±2,3
> 30 с	9,9±0,5	3,4±0,1	1,2±0,1	0,5±0,1	3,7±0,17	-14,2±0,4
5 группа (введение MRS2578 (25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. и цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до моделирования ишемии)						
до ишемии	194,1±5,6	46,4±1,6	13,2±0,2	5,8±0,2	64,9±2,24	0,0±0,3
0-10 с	118,1±9,4	28,3±2,5	7,9±0,6	3,2±0,4	39,4±4,75	-9,8±1,9
10-30 с	52,0±8,0	8,9±1,8	2,7±0,4	0,9±0,1	16,2±2,57	-13,8±2,1
> 30 с	14,2±0,6	3,5±0,1	0,9±0,1	0,4±0,1	4,7±0,14	-14,4±0,5

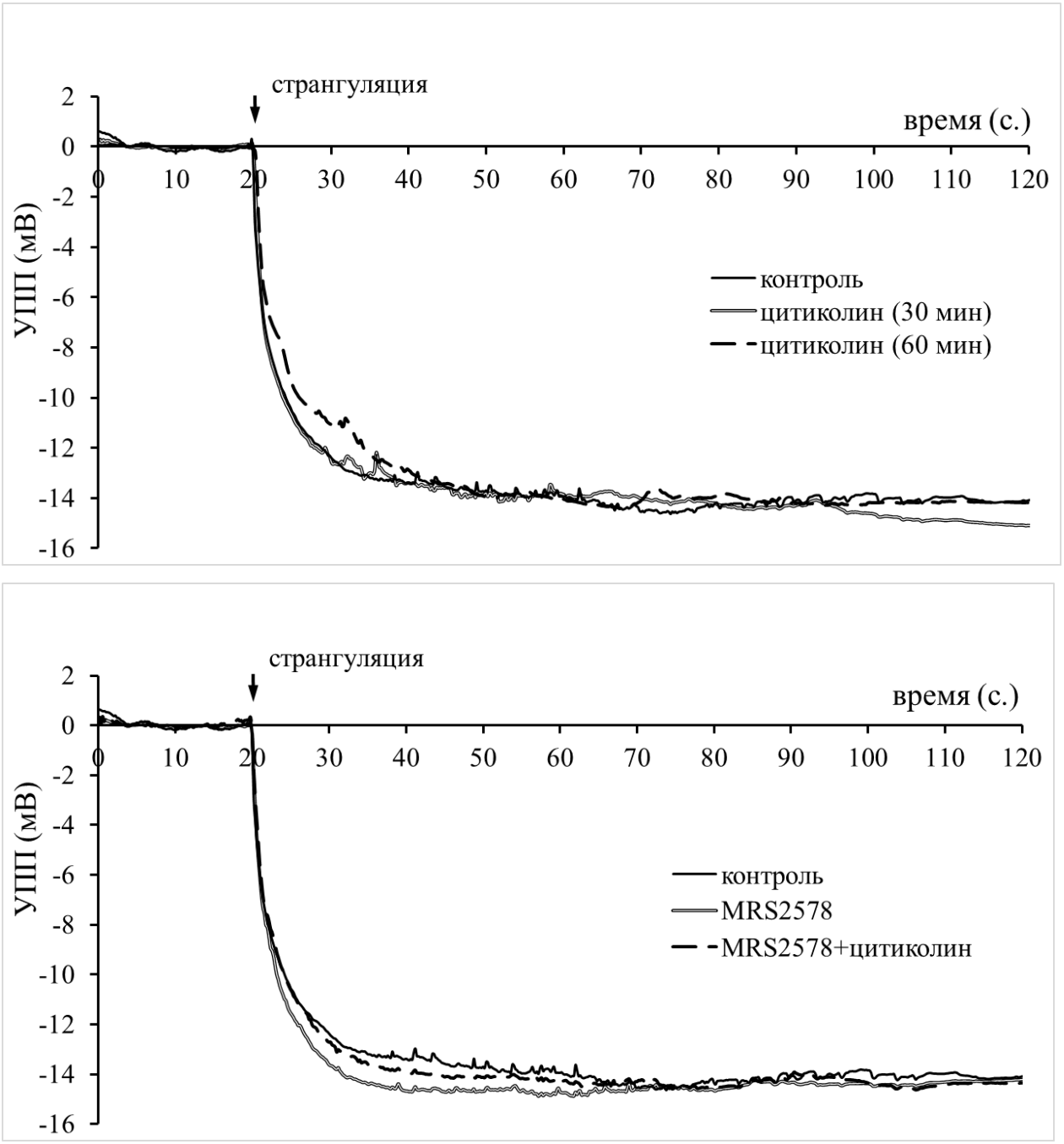


Рис. 4.6. *Изменения УПП коры головного мозга мышей при моделировании ишемии головного мозга: «контроль» - первая (контрольная) группа; «цитиколин (30 мин)» - вторая группа (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 30 минут до ишемии); «цитиколин (60 мин)» - третья группа (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до ишемии); «MRS2578» - 4 группа (введение MRS2578 (25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. до моделирования ишемии); «MRS2578+цитиколин» - 5 группа (введение MRS2578 25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. и цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до моделирования ишемии). Стрелкой указан момент странгуляции.*

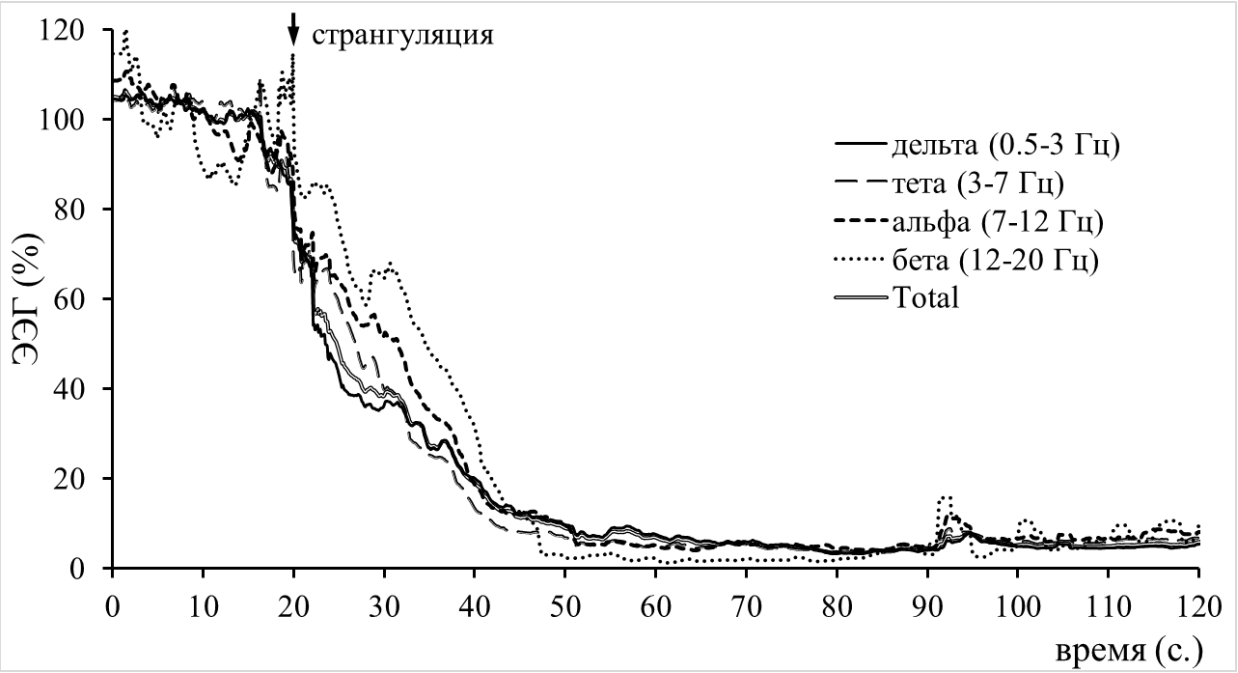


Рис. 4.7. *Изменения амплитуды отдельных частотных диапазонов ЭЭГ у мышей первой (контрольной) группы при моделировании глобальной ишемии головного мозга. Стрелкой указан момент странгуляции.*

4.2. Сравнительная оценка нейропротективного эффекта цитиколина при введении за 30 и 60 минут до моделирования глобальной ишемии головного мозга у мышей

В настоящее время основные механизмы нейропротективного эффекта цитиколина при церебральной ишемии рассматриваются преимущественно в рамках его влияния на синтез фосфолипидов в мембранах нейронов при лечебном, постишемическом назначении (Diederich K. et al., 2012; Grieb P., 2014), что не объясняет его выраженное защитное действие при однократном профилактическом назначении. Цитиколин достаточно быстро под действием цитидин-дезаминазы в плазме крови метаболизируется до уридина. Согласно данным литературы, экзогенные фракции цитидина и уридина максимально накапливаются в ткани головного мозга в химически свободной форме в среднем через 60 минут после парентерального введения (Страдомский Б.В., 1992; Secades J.J., 2016). Таким образом, можно предположить, что одним из

потенциальных механизмов нейропротективного действия цитиколина является активация его метаболитами (уридин, УДФ, УТФ, ЦДФ, ЦТФ) специфических пиримидиновых P2Y рецепторов в ЦНС (Cansev M. et al., 2013; Koyuncuoglu T. et al., 2015; von Kügelgen I., Hoffmann K., 2016) и оптимальный интервал введения этого препарата – не менее 60 минут до развития ишемии головного мозга (Krupinski J. et al.,2002). Однако прямых исследований, подтверждающих данное предположение, не проводилось.

Как видно из рис. 4.4 и 4.5. профилактическое введение цитиколина за 30 минут до моделирования глобальной ишемии головного мозга у мышей второй экспериментальной группы не сопровождалось значимыми изменениями продолжительности гаспинга и электрофизиологическими сдвигами по сравнению с контрольной группой. Развитие терминального дыхания у мышей этой группы наблюдалось в среднем через 18,3±1,1 секунды и соответствовало времени максимального угнетения электрофизиологических параметров - 18,2±1,4 секунд (рис. 4.5), средняя продолжительность гаспинга была 66,2±2,7 секунд (рис. 4.4). Наблюдаемые временные интервалы статистически не отличались от аналогичных в контрольной группе. Максимальная степень негативизации УПП в анализируемой группе регистрировалась через 15-20 секунд с момента странгуляции и составляла 14,8±0,5 мВ (рис. 4.6).

При анализе изменений отдельных частотных диапазонов обращает внимание более замедленная динамика и более меньшая степень относительной депрессии мощности ЭЭГ, в сравнении с контрольной группой, особенно в диапазоне низких частот (рис.4.8). Однако несмотря на это, абсолютная степень угнетения ЭЭГ на фоне ишемии значимо не отличалась от контрольной группы. В анализируемой группе, в первые 10 секунд суммарная амплитуда ЭЭГ снизилась на 37,0±4,1% от исходного уровня, с 64,8±3,5 мкВ до 40,8±2,7 мкВ. Снижение мощности других диапазонов составило 24-40%. Через 10-30 секунд после начала ишемии суммарная амплитуда уменьшилась в среднем на 78,2±3,2% и составила 14,1±2,1 мкВ.

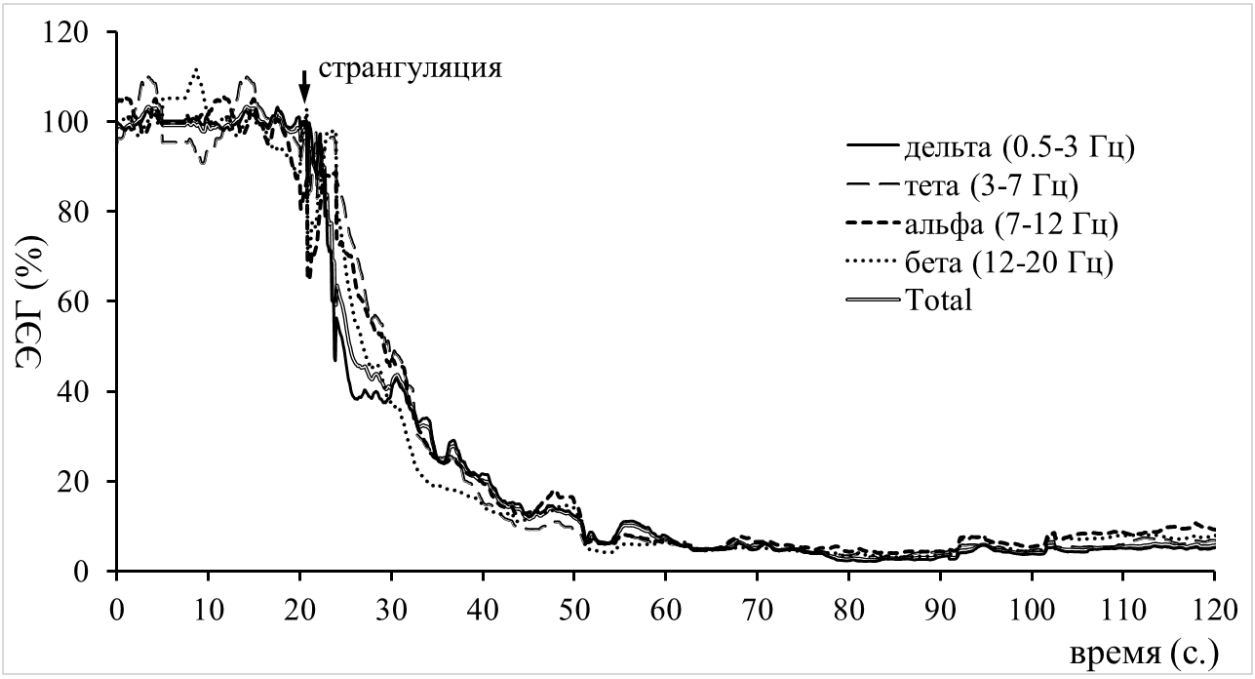


Рис. 4.8. *Изменения амплитуды отдельных частотных диапазонов ЭЭГ у мышей второй группы (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 30 минут до ишемии) при моделировании глобальной ишемии головного мозга. Стрелкой указан момент странгуляции.*

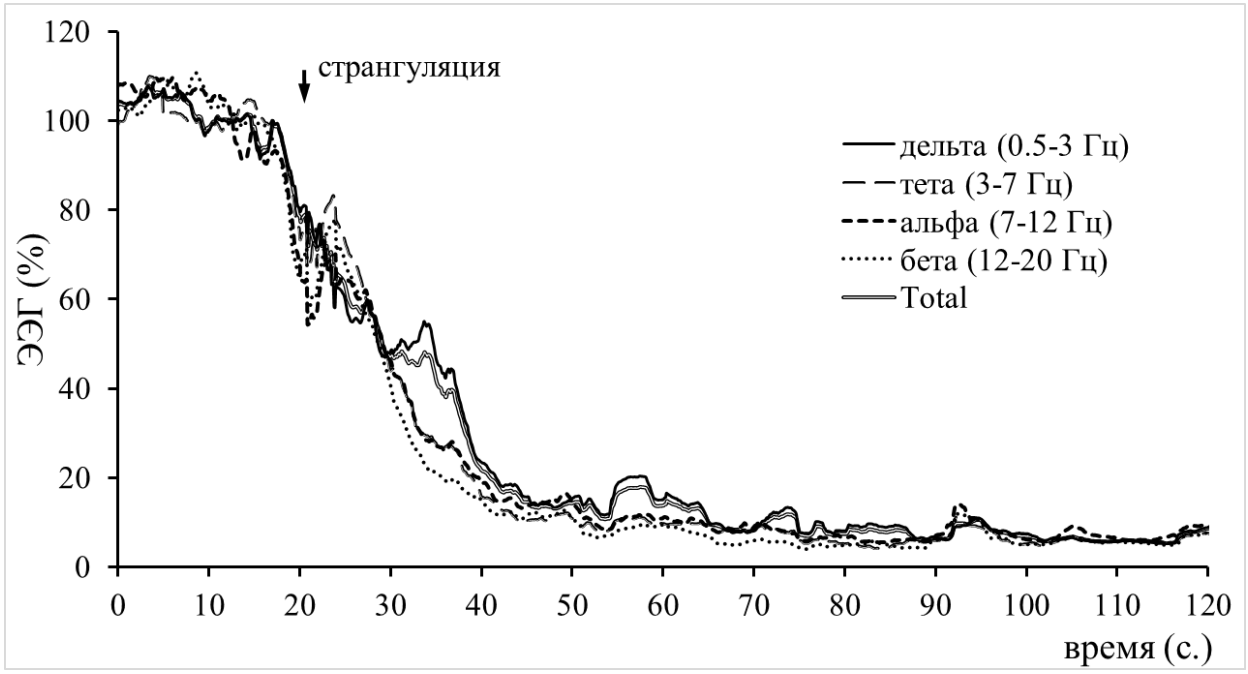


Рис. 4.9. *Изменения амплитуды отдельных частотных диапазонов ЭЭГ у мышей третьей группы (профилактическое введение цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до ишемии) при моделировании глобальной ишемии головного мозга. Стрелкой указан момент странгуляции.*

В третьей группе мышей с профилактическим в/б введения 2000 мг/кг цитиколина за 60 минут до начала ишемии объективно, в сравнении с другими группами, наблюдался более продолжительный период агонального дыхания до 86,2±4,9 секунд (P<0,05 в сравнении с контрольной группой, P<0,01 в сравнении со второй группой) (рис. 4.4). Однако латентный период появления признаков агонального дыхания не отличался от аналогичного показателя в других группах и составлял 19,4±2,2 секунды. Тотальное угнетение электрофизиологических параметров в виде максимальной негативизации УПП (до 13,0±0,4 мВ, рис. 4.6) и депрессии амплитуды ЭЭГ до 10-20% от исходного уровня регистрировалось в среднем на 22,9±1,8 секунде. (рис. 4.5), что было значимо больше, чем в контрольной и 2 экспериментальной группах (P<0,05). Как видно из рис. 4.9, суммарная амплитуда ЭЭГ в анализируемой группе в первые 10 секунд снизилась на 36,9±4,6% - с 64,2±1,4 мкВ до 40,5±2,9 мкВ, преимущественно за счет депрессии высокочастотного диапазона.

Через 10-20 секунд после начала ишемии суммарная амплитуда биоэлектрической активности в данной группе уменьшилась в среднем на 72,5±5,2% и составила 17,7±3,0 мкВ.

Таким образом, в/б введение цитиколина (2000 мг/кг) за 30 минут до моделирования глобальной ишемии головного мозга не оказывает существенного защитного действия на продолжительность жизни мышей и изменения электрофизиологических параметров в сравнении с контрольной группой. Введение цитиколина за 60 минут до моделирования глобальной странгуляционной ишемии сопровождается удлинением общей положительности жизни мышей и замедлением развития полной ишемической деполяризации и альтерации ЭЭГ в сравнении с группой контроля. Эффективность введения цитиколина за 60 минут до ишемии в сравнении с 30 минутным профилактическим введением данного препарата согласуется с данными литературы о времени накопления максимальной концентрации основного метаболита цитиколина - уридина в тканях головного мозга (Страдомский Б.В., 1992; Secades J.J., 2016)

4.3. Влияние селективного антагониста P2Y6 рецепторов MRS2578 на продолжительность гаспинга и электрофизиологические нарушения при моделировании глобальной ишемии головного мозга на фоне профилактического применения цитиколина

Для подтверждения возможного рецепторного механизма нейропротективного действия цитиколина, нами было выполнено дополнительно 2 серии экспериментов с предварительным введением MRS2578, являющегося селективным неконкурентным антагонистом пиримидиновых P2Y6 рецепторов (Weisman G.A. et al., 2012; von Kügelgen I., Hoffmann K., 2016). В отдельной серии (4 экспериментальная группа), с целью оценить влияние этого вещества на процессы ишемической деполяризации и продолжительность жизни животных при глобальной ишемии головного мозга, мы вводили его в/б в концентрации 25 мкг/кг за 90 минут до начала странгуляции.

Как видно из рис. 4.4, в данной экспериментальной группе продолжительность агонального дыхания имела тенденцию к уменьшению до 63,4±3,8 секунд, но статистических различий по этому параметру от контрольной группы не наблюдалось. Время появления первых явных агональных вдохов составляло 19,2±1,8 секунд. Среднее время максимальных электрофизиологических нарушений, несмотря на некоторую тенденцию к уменьшению, также соответствовало контрольной серии – 17,2±2,6 секунд (рис. 4.5). В первые 10 секунд ишемии суммарная амплитуда ЭЭГ снизилась в среднем на 41,3±10,1% с 65,6±1,3 мкВ до 38,4±6,6 мкВ (рис. 4.10). В период с 10 по 30 секунду моделирования ишемии амплитуда биоэлектрической активности уменьшилась до 17,9±3,5% от исходного уровня и составила 11,8±2,1 мкВ. В последующие периоды амплитуда ЭЭГ не превышала фонового шума и ее регистрируемые колебания были связаны преимущественно с дыхательными артефактами.

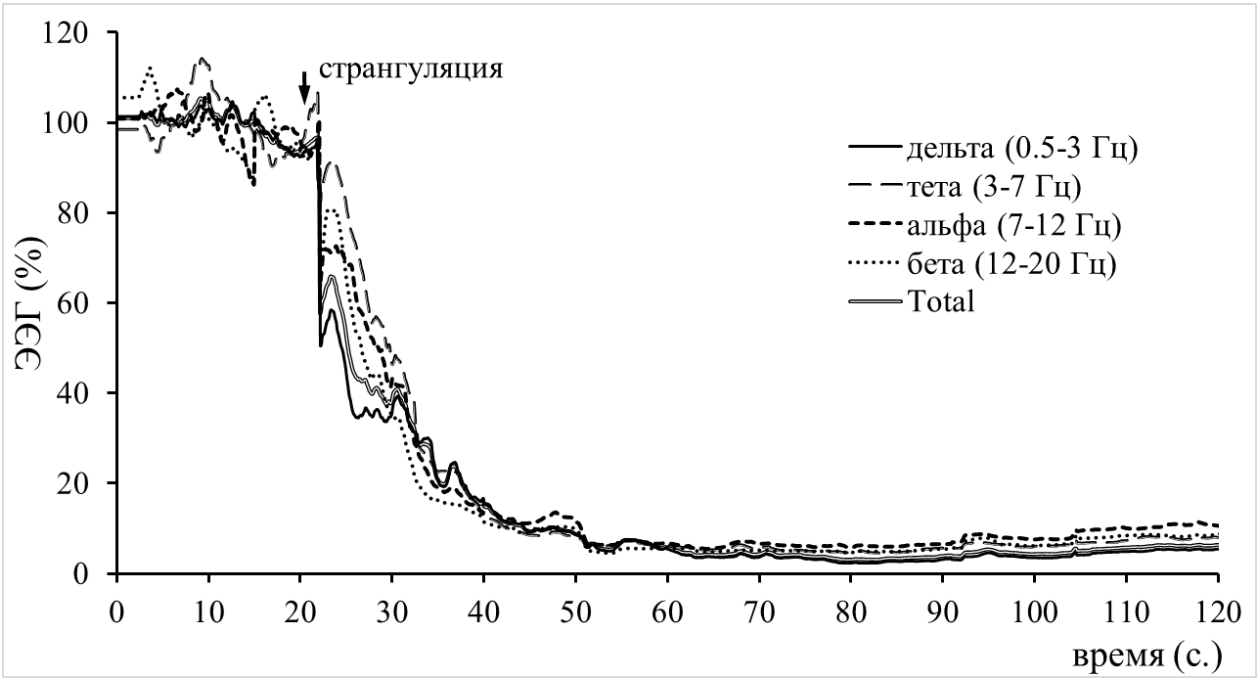


Рис. 4.10. *Изменения амплитуды отдельных частотных диапазонов ЭЭГ у мышей 4 группы (введение MRS2578 (25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. до моделирования ишемии) при моделировании глобальной ишемии головного мозга. Стрелкой указан момент странгуляции.*

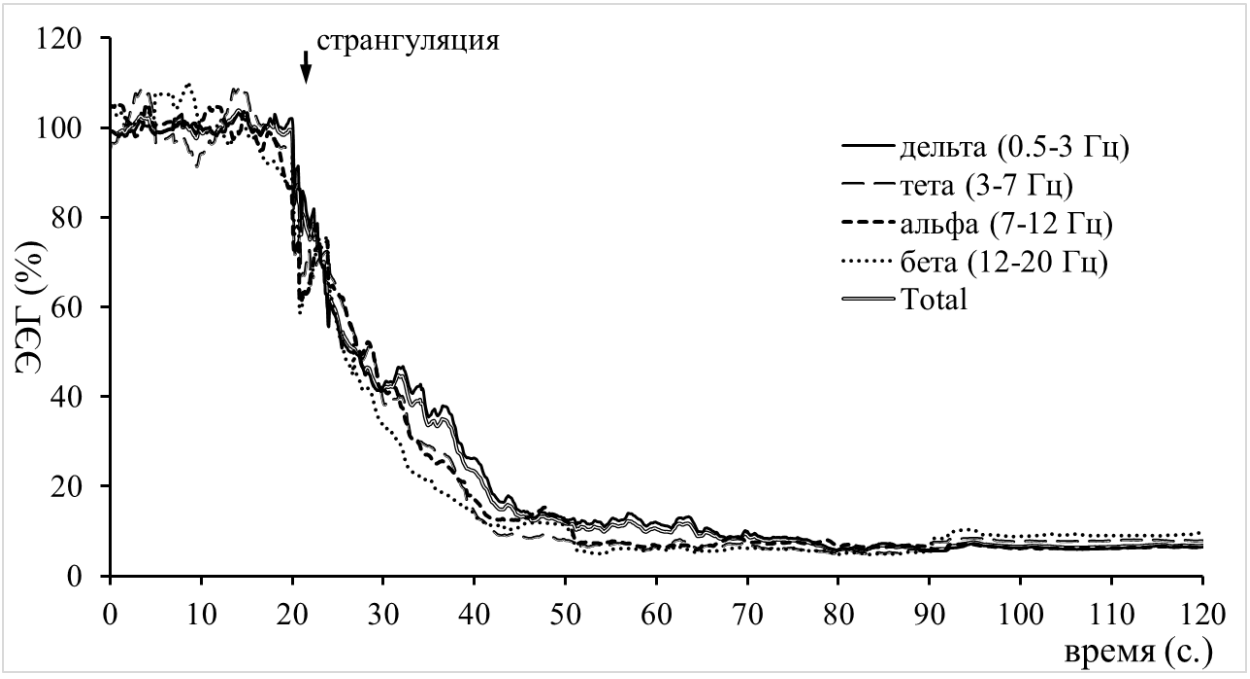


Рис. 4.11. *Изменения амплитуды отдельных частотных диапазонов ЭЭГ у мышей 5 группы (введение MRS2578 (25 мкг/кг, в/б) за 90 мин. и цитиколина (2000 мг/кг) за 60 минут до моделирования ишемии) при моделировании глобальной ишемии головного мозга. Стрелкой указан момент странгуляции.*

Максимальные электроотрицательные сдвиги УПП составили 14,4±0,36 мкВ и были сопоставимы с изменениями этого параметра в других группах (рис. 4.5).

Введение цитиколина в дозировке 2000 мг/кг через 30 минут после инъекции антагониста MRS2578 и за 60 минут до начала ишемии в 5 экспериментальной группе также не сопровождалось удлинением продолжительности терминального дыхания и времени полной деполяризации (рис. 4.4). Средняя продолжительность гаспинга составила 64,6±4,2 секунд, время начала агонального дыхания – 18,4±1,6 секунд. Электрофизиологические и другие корреляты ишемии головного мозга у мышей данной серии соответствовали аналогичным изменениям в контрольной, второй и четвертой экспериментальных группах. Максимальная амплитуда деполяризации до 14,4±0,5 мВ (рис.4.6) регистрировалась в среднем через 18,5±3,1 секунд от начала ишемии (рис. 4.5). В первые 10 секунд после странгуляции регистрировалось угнетение всех частотных диапазонов ЭЭГ на 30-40%, при этом суммарная амплитуда биоэлектрической активности уменьшилась на 39,3±7,3% - с 64,9±2,2 мкВ до 39,4±4,7 мкВ (рис. 4.11). В последующий период, через 10-30 секунд, депрессия биоэлектрической активности составила 73-83%, суммарная амплитуда ЭЭГ снизилась до 24,9±4,3% от доишемического значения.

Таким образом антагонист P2Y6 рецепторов MRS2578, несмотря на тенденцию к некоторому увеличению скорости развития электрофизиологических нарушений у экспериментальных животных, существенным образом не влияет на процессы ишемической деполяризации и не изменяет продолжительность жизни экспериментальных животных на модели глобальной ишемии головного мозга. Предварительное введение MRS2578 полностью предупреждает защитное профилактическое действие цитиколина, что предполагает роль P2Y6 рецепторов как потенциальную мишень ведущего фармакологического эффекта данного препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инсульт является второй ведущей причиной смертности и инвалидизации во всем мире (Котов С.В. и соавт., 2013; Санду Е.А. и соавт., 2016; Antonenko K. et al., 2016; O'Donnell M.J. et al., 2016; Thrift A.G. et al., 2017; Фирсов К.В. и соавт. 2019) и основной причиной заболеваемости населения, особенно в наиболее трудоспособном среднем и пожилом возрасте (Котов С.В. и соавт., 2013; Санду Е.А. и соавт., 2016; O'Donnell M.J. et al., 2016; Antonenko K. et al., 2016; Thrift A.G. et al., 2017). Фактором, повышающим важность исследований, посвященных разработке и адаптации методов лечения первичных и вторичных ишемических повреждений ЦНС, является высокая частота данных нарушений в результате нейрохирургических и кардиохирургических оперативных вмешательств, которые ухудшают прогноз и реабилитационный потенциал пациентов (Суфианова Г.З., 2003, 2014; Ricarte I.F. et al., 2015; Badenes R. et al., 2015; Kashkoush A.I. et al., 2017; Gopalakrishnan M.S. et al., 2018; Hood R. et al., 2018; Raffa G.M. et al., 2019).

Ишемия нервной ткани представляет собой сложный динамический и потенциально обратимый процесс, включающий совокупность гемодинамических и метаболических изменений, происходящих при недостаточности кровоснабжения головного мозга (Виленский Б.С., 2008) и приводящих к дисфункции и гибели нервных клеток (Гусев Е.И. и соавт., 2003; Суфианова Г.З., Шапкин А.Г., 2014).

Использование адекватных и легко воспроизводимых моделей ишемических расстройств в опытах in vivo и in vitro играет огромную роль для систематического изучения патологических механизмов развития ишемии центральной нервной системы и изыскания путей их фармакологической коррекции (Суфианова Г.З. и соавт., 2002; Суфианова Г.З., Шапкин А.Г., 2014; Mergenthaler P. et al., 2004; Sicard K.M., Fisher M., 2009; Sommer C.J., 2017). В зависимости от целей исследования используют модели фокальной или глобальной ишемии головного мозга.

Нами была разработана новая высокоэффективная и воспроизводимая модель транзиторной ишемии головного мозга путем внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии. Суть нового способа моделирования, в отличии от других подобных моделей, заключается в использовании в качестве внутрисосудистого окклюдера нити из материала на основе полигликона, что обеспечивает незначительное набухание и постепенное размягчение окклюдера при контакте с кровью и позволяет предупредить повреждение сосудистой стенки при интравазальном введении окклюдера. Разработанная модель транзиторной фокальной ишемии головного мозга может использоваться для изучения фармакологических эффектов лекарственных препаратов с потенциальными нейропротективными свойствам. Для моделирования глобальной ишемии головного мозга мы использовали модификацию модели глобальной странгуляционной ишемии (Hirsch H. et al., 1957; Eleff S.M. et al., 1991; Суфианова Г.З., 1994; Кулинский В.И. и соавт., 1996; Волчегорский И.А. и соавт., 2014). На данной модели, с использованием нейрофизиологического мониторинга были объективизированы методы оценки выраженности ишемии. Было установлено, что глобальная ишемия головного мозга, вызванная странгуляцией, сопровождается быстрым снижением локального мозгового кровотока у мышей и альтерацией спонтанной биоэлектрической активности коры головного мозга в виде негативизации УПП, отражающего развитие ишемической деполяризации и депрессии амплитуды электроэнцефалограммы, указывающей на угнетение функциональной активности коры головного мозга на фоне ишемии. Таким образом, регистрация электрофизиологических параметров может использоваться для верификации развития ишемической деполяризации нервной ткани в качестве объективного диагностического критерия, позволяющего проводить сравнительную оценку нейропротективных свойств различных лекарственных препаратов.

Основной современный подход к фармакологической коррекции патобиохимических нарушений при повреждении нервной ткани – применение лекарственных средств с плейотропным действием, включающем нейрорепаративный и нейропротективный эффекты и модулирование нейропластичности (Суфианова Г.З., 2003, 2014; Cansev M. et al., 2008; Candelario-Jalil E., 2009; Morton C.C. et al., 2013; Badenes R. et al., 2015; Gimenez C. et al., 2018; Tang K.S., Tan J.S., 2019; Albrecht M. et al., 2019). Таргетным воздействием на ключевые звенья процессов повреждения нервной ткани гипоксического, ишемического, травматического или другого генеза обладает препарат из группы нейропротекторов - цитиколин (цитидин-5-дифосфохолин, ЦДФ-холин) – естественный эндогенный мононуклеотид, идентичный фосфатидилхолину, и состоящий из холина, пирофосфата и цитидина (Grieb P., 2014; Secades J.J., 2016; El Sayed I., 2018).

В последние годы цитиколин является объектом особого интереса как эффективное нейропротективное средство (Secades J.J., Frontera G., 1995; Bustamante A. et al., 2013; Alvarez-Sabín J., Román G.C., 2013; Mushba A.V. et al., 2016). В частности, во многих экспериментальных исследованиях было обнаружено, что этот препарат предотвращает повреждение нервных клеток на различных моделях ишемии головного мозга (Hurtado O. et al., 2005; Diederich K. et al., 2012; Bustamante A. et al., 2013). Экспериментальные данные были неоднократно подтверждены во многих клинических исследованиях (Alvarez-Sabín J., Román G.C., 2013; Mushba A.V. et al., 2016). При этом было установлено, что наиболее раннее назначение цитиколина при острых нарушениях мозгового кровообращения существенно улучшает функциональные исходы и реабилитацию пациентов (Cotroneo A.M. et al., 2013; Mushba A.V. et al., 2016). Несмотря на достаточно большое количество публикаций, посвященных оценке защитного действия данного препарата при церебральной ишемии, механизмы действия цитиколина рассматриваются преимущественно в рамках его влияния на синтез фосфолипидов в мембранах нейронов при лечебном, постишемическом назначении (Diederich K. et al.,

2012; Grieb P., 2014). Предполагается, что цитиколин является пролекарством, которое после приема последовательно гидролизуется и дефосфорилируется до цитидина, уридина и холина, затем эти метаболиты по отдельности попадают в ткани мозга и используются для ресинтеза ЦДФ-холина, который поддерживает биосинтез клеточных фосфолипидов (Grieb P., 2014). Необходимо отметить небольшое количество экспериментальных и практически полное отсутствие клинических исследований, посвященных изучению нейропротективной активности цитиколина при профилактическом (до ишемическом) назначении (Mir C. et al., 2003; Hurtado O. et al., 2005).

В нашем исследовании мы провели сравнительную оценку нейропротективного действия цитиколина при профилактическом и лечебном назначении в эксперименте на модели фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс. Как видно из полученных результатов, при назначении цитиколина в раннем в постишемическом периоде практически не отмечается улучшение неврологических функций, изменения концентрации нейроспецифических белков и морфологического повреждения нервной ткани в сравнении с контрольной группой. Данное расхождение с результатами исследований других авторов возможно связаны с тем, что препарат вводился в относительно короткий период, в то время как для оценки репаративных эффектов требуется более длительное время (Grieb P., 2014). Более эффективно с целью нейропротекции было назначение цитиколина с профилактической целью. Однако, выраженное защитное действие этого препарата при однократном профилактическом назначении нельзя однозначно объяснить его влиянием на синтез фосфолипидов. Более логичным объяснением может быть активация метаболитами цитиколина (в частности, уридином) специфических пиримидиновых P2Y рецепторов на мембранах нервных клеток (Cansev M. et al., 2013; Koyuncuoglu T. et al., 2015; von Kügelgen I., Hoffmann K., 2016). В настоящее время идентифицированы специфические мембранные рецепторы, относящиеся к подклассу P2 рецепторов, лигандами которых являются пурины и пиримидины, в частности

УТФ и УДФ (Kügelgen I., Hoffmann K., 2016). Информация о потенциальных механизмах действия этих нуклеотидов только начинает накапливаться. Появляются данные о топографическом распределении пиримидиновых рецепторов и месте их связывания в головном мозге (Weisman G.A. et al., 2012). Установлено, что пиримидиновые рецепторы (P2Y2, P2Y4, P2Y6 и P2Y14) могут регулировать защитные механизмы в ЦНС в различных патологических условиях. Ряд эндогенных нуклеозидов, в частности уридин, его предшественники (ЦДФ-холин) и синтетические агонисты P2Y рецепторов можно использовать как потенциальные нейропротективные средства при повреждении головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях. Для подтверждения временных интервалов эффективности цитиколина и потенциальной рецепторной мишени нейропротективного действия этого препарата мы выполнили серию экспериментов с моделированием глобальной ишемии головного мозга у мышей. Цитиколин вводился в разные временные интервалы до ишемии и на фоне предварительно введения селективного неконкурентного блокатора пиримидиновых P2Y6 рецепторов MRS2578 (Weisman G.A. et al., 2012; von Kügelgen I., Hoffmann K., 2016).

Нами показано, что введение цитиколина за 30 минут до ишемии головного мозга не оказывает существенного защитного действия на продолжительность жизни мышей и изменения электрофизиологических параметров в сравнении с контрольной группой. Введение цитиколина за 60 минут до моделирования глобальной странгуляционной ишемии сопровождается удлинением общей положительности жизни мышей и замедлением развития полной ишемической деполяризации и альтерации ЭЭГ в сравнении с другими группами. Эффективность введения цитиколина за 60 минут до ишемии в сравнении с 30 минутным профилактическим введением данного препарата согласуется с данными литературы о времени накопления максимальной концентрации основного метаболита цитиколина - уридина в тканях головного мозга (Страдомский Б.В., 1992; Secades J.J., 2016).

Нами установлено, что антагонист P2Y6 рецепторов MRS2578 существенным образом не влияет на процессы ишемической деполяризации и продолжительность жизни экспериментальных животных на модели глобальной ишемии головного мозга, при этом данный антагонист полностью предупреждает нейропротективное профилактическое действие цитиколина, что предполагает роль пиримидиновых рецепторов как потенциальную мишень ведущего фармакологического эффекта ЦДФ-холина.

Дальнейшее изучение рецепторных механизмов фармакологических эффектов данного препарата является перспективным для понимания механизмов активности цитиколина в клинической практике, для предупреждения и коррекции ишемических нарушений и нейродегенеративных заболеваний (Weisman G.A. et al., 2012; Kügelgen I., Hoffmann K., 2016). Цитиколин является препаратом выбора для лечения цереброваскулярных заболеваний, поскольку его клиническое применение оправдано фармакологическими эффектами, которые он оказывает на центральную нервную систему (Ghosh S. et al., 2010).

ВЫВОДЫ

1. Введение цитиколина при фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс в раннем постишемическом периоде не сопровождается значимыми изменениями неврологического статуса, концентрации нейроспецифических белков, летальности и выраженности гистопатологических нарушений в сравнении с группой контроля.
2. Профилактическое введение цитиколина, в сравнении с его лечебным действием, при моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга у крыс сопровождается меньшей степенью неврологических нарушений, снижением летальности и уменьшением выраженности повреждения головного мозга.
3. Введение цитиколина за 60 минут до моделирования глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей, в отличие от его введения за 30 минут, сопровождается более выраженным удлинением общей продолжительности гаспинга и замедлением развития полной ишемической деполяризации.
4. Селективный антагонист пиримидиновых P2Y6 рецепторов MRS2578 не влияет на процессы ишемической деполяризации и продолжительность гаспинга у животных на модели глобальной ишемии головного мозга.
5. MRS2578 полностью блокирует нейропротективное действие цитиколина, что предполагает роль P2Y6 рецепторов как потенциальную мишень ведущего фармакологического эффекта цитиколина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная модель транзиторной фокальной ишемии головного мозга может использоваться для изучения фармакологических эффектов лекарственных препаратов с потенциальными нейропротективными свойствами.
2. Регистрация УПП и ЭЭГ, отражающих динамику поляризационных процессов, может использоваться для верификации развития ишемической деполяризации нервной ткани в качестве объективного диагностического критерия, позволяющего проводить сравнительную оценку нейропротективных свойств лекарственных препаратов.
3. Целесообразно использование цитиколина с профилактической целью в клинической практике для предупреждения вторичных ишемических нарушений в раннем послеоперационном периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонь, Е.И. Методы оценки неврологических нарушений в эксперименте / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович // Вестник ВГМУ. – 2018. – №4. – С. 22-28
2. Виленский, Б.С. Инсульт – современное состояние проблемы / Б.С. Виленский // Неврологический журнал. – 2008. – Т. 13, №2. – С. 1-11.
3. Волчегорский, И.А. Влияние производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты на устойчивость к острой церебральной ишемии в эксперименте / А.В. Калугина, М.П. Малкин, И.Ю. Мирошниченко, К.Е. Пряхина, Л.М. Рассохина, Р.М. Файзуллин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – №12. – С. 123-127.
4. Гнездицкий, В.В. Обратная задача ЭЭГ и клиническая электроэнцефалография (картирование и локализация источников электрической активности мозга) / В.В. Гнездицкий. – М.: МЕДпресс.информ, 2004. – С. 624.
5. Годков, И.М. Факторы риска интраоперационных осложнений в хирургии церебральных артериальных аневризм: дисс... канд. мед. наук: 14.00.28 / И.М. Годков – М., 2009. –156 с.
6. Гусев, Е.И. Эффективность использования ноотропила у больных с церебральным инсультом / Е.И. Гусев // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. – 2008. – Т. 108, №1. – С. 82-86.
7. Гусев, Е.И. Церебральный инсульт: проблемы и решения / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, М.Ю. Мартынов // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2003. – №11. – С. 44-48.
8. Домашенко, М.А. Применение цитиколина в остром периоде ишемического инсульта: от доказательной медицины к реальной клинической практике / М.А. Домашенко, М.А. Пирадов, Д.В. Сергеев, М.Ю. Максимова // Русский медицинский журнал. – 2014. – Т. 22, № 22. – С. 1609-1612.

9. Каркищенко, Н.Н. Психофармакологические свойства эндогенных пиримидиновых нуклеозидов / Н.Н. Каркищенко, Б.В. Страдомский // Химико-фармацевтический журнал. – 1991. – №25. – С. 4-6.
10. Котов, С.В. Инсульт: руководство для врачей / С.В. Котов, Л.В. Стаховская, Е.В. Исакова, Г.Е. Иванова, Н.А. Шамалов и др.; под ред. Л.В. Стаховской, С.В. Котова. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2013. – 400 с.
11. Кулинский, В.И. Странгуляционная модель ишемии головного мозга у мышей с преимущественным нарушением кровоснабжения больших полушарий / В.И. Кулинский, Г.В. Мехельсон, Г.З. Суфианова, Т.Н. Медведева, В.Ю. Ковтун // Нейрохимия. – 1996. – Т. 13, №1. – С. 56-60.
12. Литвиненко, И.В. Особенности послеоперационной мозговой дисфункции в зависимости от типа и позиции имплантируемого протеза клапана сердца / И.В. Литвиненко, М.М. Одинак, Н.В. Цыган, Р.В. Андреев, А.С. Пелешок, Е.С. Курасов, В.А. Яковлева, А.В. Рябцев // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, №2. – С. 18-22.
13. Санду, Е.А. Анализ эффективности программы «Оценка риска инсульта» для выявления лиц с высоким риском инсульта / Е.А. Санду, А.С. Котов, М.А. Литвиненко, Е.К. Сорокина, Е.В. Исакова, С.В. Котов // Клиническая геронтология. – 2016. – Т. 22, №5-6. – С. 10-17.
14. Страдомский, Б.В. О роли эндогенных пиримидинов как модуляторов психо-эмоционального статуса человека и животных / Б.В. Страдомский // Автореф. дис. … докт. биол. наук. – М., 1992. – С. 38.
15. Суфианов, А.А. Использование метода локального преобразования Фурье для оценки электроэнцефалографических изменений у пациентов после ликворошунтирующих и нейроэндоскопических операций по поводу гидроцефалии / А.А. Суфианов, А.Г. Шапкин, Г.З. Суфианова, Е.А. Чимытова, М.В. Таборов // Нейрохирургия. – 2010. –№2. – С. 47-51.

16. Суфианова, Г.З. Нейропротекторное действие агонистов аденозиновых рецепторов при фокальных ишемических и травматических повреждениях ЦНС: дисс. … докт. мед. наук / Г.З. Суфианова. – СПБ, 2003. – 419 с.
17. Суфианова, Г.З. Повышение устойчивости головного мозга к острой ишемии агонистами аденозиновых рецепторов: дисс. … канд. мед. наук / Г.З. Суфианова. – Иркутск, 1994. – 209 с.
18. Суфианова, Г.З. Защитное действие циклопентиладенозина на малоинвазивной модели острой фокальной ишемии головного мозга у крыс / Г.З. Суфианова, Л.А. Усов, А.А. Суфианов, А.Г. Шапкин, Л.Ю. Раевская // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65, №1. – С. 24-26.
19. Суфианова, Г.З. Повреждение нервной ткани: механизмы, модели, методы оценки / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин. – М.: Издательство РАМН, 2014. – С. 288.
20. Тихомирова, И.А. Оценка состояния микроциркуляции при нарушениях мозгового кровообращения по данным лазерной допплеровской флоуметрии и гемореологическим показателям / И.А. Тихомирова, С.Г. Михайлова, С.В. Лыченко, А.О. Ослякова // Физиология человека. – 2012. – №1. – С. 69-76.
21. Фирсов, К.В. Генетически детерминированные причины инсульта у молодых пациентов / К.В. Фирсов, А.С. Котов, М.С. Бунак // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, №1. – С. 102-109.
22. Шавловская, О. А. Нейропротективная терапия неврологического дефицита при цереброваскулярной патологии / О.А. Шавловская // Практикующий врач сегодня. – 2012. – №3. – С. 39-44.
23. Abbracchio, M.P. Purinergic signalling in the nervous system: an overview / M.P. Abbracchio, G. Burnstock, A. Verkhratsky, H. Zimmermann // Trends in Neurosciences. – 2009. – №32. – P. 19-29.

24. Abbracchio, M.P. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy / M.P. Abbracchio, G. Burnstock, J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy C., G.E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K.A. Jacobson, G.A. Weisman // Pharmacological Reviews. – 2006. – Vol. 58, №3. – P. 281-341.
25. Adibhatla, R.M. Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia / R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher // Journal of Neuroscience Research. – 2002. – № 70. – P. 133-139.
26. Adibhatla, R.M. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders / R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher // Neurochemical Research. – 2005. – Vol. 30, №1. – P. 15-23.
27. Adibhatla, R.M. Role of Lipids in Brain Injury and Diseases / R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher // Future Lipidology. – 2007. – Vol. 2, №4. – P. 403-422.
28. Adibhatla, R.M. Citicoline: neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia / R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher, R.J. Dempsey // Journal of Neurochemistry. – 2002. – Vol. 80, №1. – P. 12-23.
29. Agarwal, N. Short-term administration of uridine increases brain membrane phospholipid precursors in healthy adults: a 31-phosphorus magnetic resonance spectroscopy study at 4T / N. Agarwal, Y.H. Sung, J.E. Jensen, G. daCunha, D. Harper, D. Olson, P.F. Renshaw // Bipolar Disorder. – 2010. – Vol. 12, №8. – P. 825-833.
30. Alberghina, M. Effects of CDP-choline on the biosynthesis of nucleic acids and proteins in brain regions during hypoxia / M. Alberghina, M. Viola, A. Mistretta, A.M. Giuffrida // Neurochemical Research – 1981. – №6. – P. 607-618.
31. Albrecht, M. Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia: Taking aim at NOS / M. Albrecht, K. Zitta, F. Groenendaal, F. van Bel, C. Peeters-Scholte // Free Radical Bio. Med. – 2019. – pii: S0891-5849(18)32471-7

32. Alvarez-Sabin, J. The role of citicoline in neuroprotection and neurorepair in ischemic stroke / J. Alvarez-Sabin, G. Ortega, C. Jacas et al. // Brain Sciences. – 2013. – №3. – P. 1395-1414.
33. Alvarez-Sabín, J. The role of citicoline in neuroprotection and neurorepair in ischemic stroke / J. Alvarez-Sabín, G.C. Román // Brain Sciences. – 2013. – Vol. 3, №3. – P. 1395-1414.
34. Antonenko, K. Sex-related differences in risk factors, type of treatment received and outcomes in patients with atrial fibrillation and acute stroke: Results from the RAF-study (Early Recurrence and Cerebral Bleeding in Patients with Acute Ischemic Stroke and Atrial Fibrillation) / K. Antonenko, M. Paciaroni, G. Agnelli et al. // European Stroke Jornal. – 2016. – Vol. 2, №1. – P. 46-53.
35. Back, T. Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: effect on infarct morphology / T. Back, M.D. Ginsberg, W.D. Dietrich et al. // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1996. – №16. – P. 202-213.
36. Badenes, R. Cerebral protection during neurosurgery and stroke / R. Badenes, S.E. Gruenbaum, F. Bilotta // Current Opinion in Anesthesiology. – 2015. – Vol. 28, №5. – P. 532-536.
37. Bagchi, S. The P2Y2 nucleotide receptor interacts with αv integrins to activate Go and induce cell migration / S. Bagchi, Z. Liao, F.A. Gonzalez, N.E. Chorna, C.I. Seye, G.A. Weisman, L. Erb // Joural of Bioligical Chemistry. – 2005. – Vol. 280, № 47. – P. 39050-39057.
38. Bederson, J.B. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination / J.B. Bederson, L.H. Pitts, M. Tsuji, M.C. Nishimura, R.L. Davis, H. Bartkowski // Stroke. – 1986. – Vol. 17, №3. – P. 472-476.
39. Beek, E.M. The potential role of nutritional components in the management of Alzheimer's Disease / E.M. Beek, P. Kamphuis // European Journal of Pharmacology. – 2008. – №585. – P. 197-207.

40. Beschin, N. What the eyes perceive, the brain ignores: a case of pure unilateral representational neglect / N. Beschin, G. Cocchini, S. Della Sala, R.H. Logie // Cortex. – 1997. – №33. – P. 3-26.
41. Bianco, F. Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia / F. Bianco, M. Fumagalli, E. Pravettoni, N. D'Ambrosi, C. Volonte, M. Matteoli, M.P. Abbracchio, C. Verderio // Brain Research Reviews. – 2005. – Vol. 48, №2. – P. 144-156.
42. Boismare, F. Effects hemodynamiques, fonctionelles et biochimiques de l'hypoxie hupobare chez le rat traite par la cytidine diphosphocholine / F. Boismare, M. Le Poncin-Lafitte, J.R. Rapin // C. R. Soc. Biol. – 1978. – №172. – P. 651-658.
43. Boucsein, C. Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro / C. Boucsein, R. Zacharias, K. Färber, S. Pavlovic, U.K. Hanisch, H. Kettenmann // European Journal of Neuroscience. – 2003. – Vol. 17, № 11. – P. 2267-2276.
44. Bourget, P. A. Pyrimidine biosynthesis in rat brain / P.A. Bouget, G.C. Tremblay // Journal of Neurochemistry. – 1972. – №19. – P. 1617-1624.
45. Burnstock, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission / G. Burnstock // Physiological reviews. – 2007. – №87. – P. 659-797.
46. Campbell, B.C.V. Penumbral imaging and functional outcome in patients with anterior circulation ischaemic stroketreated with endovascular thrombectomy versus medical therapy: a meta-analysis of individual patient-level data / Bruce C.V. Campbell et. al. // The Lancet Neurology. – 2019. – Vol. 18, №1. – P. 46-55.
47. Candelario-Jalil, E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: Considerations for the development of novel neurotherapeutics / E. Candelario-Jalil // Current opinion in investigational drugs. – 2009. – Vol. 10. – P. 644-654.

48. Cansev, M. Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization / M. Cansey // Brain Research Reviews. – 2006. – Vol. 52. – P. 389-397.
49. Cansev, M. Oral uridine-5'-monophosphate (UMP) increases brain CDP-choline levels in gerbils / M. Cansey, C.J. Watkins, E.M. van der Beek, R.J. Wurtman // Brain Research. – 2005. – Vol. 1058, №1-2. – P. 101-108.
50. Carlezon, W.A. Antidepressant-like effects of uridine and omega-3 fatty acids are potentiated by combined treatment in rats / W.A. Carlezon, S.D. Jr. Mague, A.M. Parow, A.L. Stoll, B.M. Cohen, P.F. Renshaw // Biological Psychiatry. – 2005. – №57. – P. 343-350.
51. Chamorro, Á. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation / A. Chamorro, U. Dirnagl, X. Urra, A.M. Planas // The Lancet Neurology. – 2016. – Vol. 15, №8. – P. 869-881.
52. Chen, H.S. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists / H.S. Chen // Journal of Neurochemistry. – 2006. – Vol. 97, №6. – P. 1611-1626.
53. Chen, H. Oxidative Stress In Ischemic Brain Damage: Mechanisms Of Cell Death And Potential Molecular Targets For Neuroprotection / H. Chen, H. Yoshioka, J.S. Kim, J.E. Jung, N. Okami // Antioxidant & Redox Signaling. – 2011. – Vol. 14, № 8. – P. 1505-1517.
54. Ciancarelli, I. Oxidative Stress In PostAcute Ischemic Stroke Patients:Relevance Of Early Intensive Neurorehabilitation / I. Ciancarelli, C. Pistarini, A. Carolei, M.G. Tozzi // Journal of Neurology & Neurophysiology. – 2013. – Vol. 4, №3. – P. 1-4.
55. Clark, W.M. A randomized dose-response trial of citicoline in acute ischemic stroke patients / W.M. Clark, S.J. Warach, J.C. Pettigrew, R.T. Gammans, L.A. Sabounjian // Neurology. – 1997. – №49. – P. 671-678.
56. Clark, W.M. A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients / W.M. Clark, L.R. Wechsler, L.A. Sabounjian, U.E. Schwiderski // Neurology. – 2001. – Vol. 57. – P. 1595-1602.

57. Cornford, E.M. Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors / E.M. Cornford, W.H. Oldendorf // Biochimica et Biophysica Acta. – 1975. – №394. – P. 211-219.
58. Crow, M.T. The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis / M.T. Crow, K. Mani, Nam Young-Jae, R.N. Kitsis // Circulation Research. – 2004. – №95. – P. 957-970.
59. Davalos, A. Oral citicoline in acute ischemic stroke / J. Castillo, J. Alvares-Sabin et al. // Stroke. – 2002. – №33. – P. 2850-2857.
60. Davis, S. Time is Penumbra: imaging, selection and outcome. The Johann jacob wepfer award 2014 / S. Davis // Cerebrovascular Diseases. – 2014. – Vol. 38, №1. – P. 59-72.
61. Dirnagi, U. Pathobiology of Ischemic Stroke: An Integrated View / U. Dirnagi, C. Iadecola, M.A. Moskowitz // Trends in Neurosciences. –1999. –№22. – P. 391-397.
62. Dobolyi, A. Purine and pyrimidine nucleoside content of the neuronal extracellular space in rat. An in vivo microdialysis study / A. Dobolyi, A. Reichart A., T. Szikra, G. Juhasz // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 1998. – №431. – P. 83-87.
63. El Sayed, I. A meta-analysis of the effect of different neuroprotective drugs in management of patients with traumatic brain injury / I. El Sayed, A. Zaki, A.M. Fayed, G.M. Shehata, S. Abdelmonem // Neurosurgical Review. – 2018. – Vol. 41, №2. – P. 427-438.
64. Eleff, S.M. Sodium, ATP, and intracellular pH transients during reversible complete ischemia of dog cerebrum / S.M. Eleff, Y. Maruki, L.H. Monsein, R.J. Traystman, R.N. Bryan, R.C. Koehler // Stroke. – 1991. – Vol. 22, №2. – P. 233-241.
65. Elliott, M.R. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance / M.R. Elliott, F.B. Chekeni, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski et. al. // Nature. – 2009. – №461. – P. 282-286.

66. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / S. Elmore // Toxicologic Pathology. – 2007. – Vol. 35, №4. – P. 495-516.
67. Erecinska, M. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia / M. Erecinska M., I.A. Silver // Respiratory Physiology. – 2001. – №128. – P. 263-276.
68. Erlinge, D. P2Y receptors in health and disease / D. Erlinge // Advances in Pharmacology. – 2011. – № 61. – P. 417-439.
69. Favaloro, B. Role of Apoptosis in disease / B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano, C.D. Ilio, V.D. Laurenzi // Aging. – 2012. – Vol. 4, №5. – P. 330-349.
70. Fedorova, T.N. Oxidative Status in Different Areas of the Cerebral Cortex of Wistar Rats during Focal Ischemia and Its Modulation with Carnosine / T.N. Fedorova, A.A. Devyatov, D.S. Berezhnoi, S.L. Stvolinskii et. al. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018. – Vol. 165, №6. – P. 746-750.
71. Franke, H. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS / H. Franke, P. Illes // Pharmacology & Therapeutics. – 2006. – Vol. 109, №3. – P. 297-324.
72. Geiger, A. Cytdine and uridine requirement of the brain / A. Geiger, S. Yamasaki // Journal of Neurochemistry. – 1956. – №1. – P. 93-100.
73. Genchev, D.D. CTP synthetase activity in neonatal and adult rat brain / D.D. Genchev, P. Mandel // Neurochemistry International. – 1974. – №22. – P. 1027-1030.
74. Ghosh, S. Mannosylated liposomal cytidine 5' diphosphocholine prevent age related global moderate cerebral ischemia reperfusion induced mitochondrial cytochrome c release in aged rat brain / S. Ghosh, N. Das, A.K. Mandal, S.R. Dungdung, S. Sarkar // Neuroscience. – 2010. – Vol. 171, №4. – P. 1287-1299.
75. Gimenez, C. Pathophysiology of the glutamate and the glycine transporters: new therapeutic targets / C. Gimenez, F. Zafra, C. Aragon // Revista de Neurologia. – 2018. – Vol. 67, №12. – P. 491-504.

76. Giralt, D. Selecting the optimal dose of citicoline treatment in animal models of focal cerebral ischemia through a meta-analysis / D. Giralt, L. Garcha-Bonilla, M. Campos, V. Sosti, A. Rosell, J. Montaner // Cerebrovascular Diseases. – 2010. – №29. – P. 165.
77. Gnati, L.F. Effects of chronic treatment with uridine on striatal dopamine release and dopamine related behaviours in the absence or the presence of chronic treatment with haloperidol / L.F. Gnati, K. Fuxe, M. Ruggeri, E. Merlo Pich et. al. // Neurochemistry International. – 1989. – №15. – P. 107-113.
78. Gopalakrishnan, M.S. Complications of Decompressive Craniectomy / M.S. Gopalakrishnan, N.C. Shanbhag, D.P. Shukla, S.K. Konar, D.I. Bhat, B.I. Devi // Frontiers in Neurology. – 2018. – №9. – P. 977.
79. Grieb, P. Neuroprotective properties of citicoline: facts, doubts and unresolved issues / P. Grieb // CNS Drugs. – 2014. – Vol. 28, №3. – P. 185-193.
80. Grimm, I. Coordinate pathways for nucleotide and EGF signaling in cultured adult neural progenitor cells / I. Grimm, N. Messemer, M. Stanke, C. Gachet, H. Zimmermann // Journal of Cell Science. – 2009. – №122. – P. 2524-2533.
81. Guillen-Gomez, E. Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats / E. Guillen-Gomez, M. Calbet, J. Casado, L. de Lecea, E. Soriano, M. Pastor-Anglada, F. Burgaya // Neurochemistry. – 2004. – №90. – P. 883-893.
82. Guns, P.J. Endothelium-dependent relaxation evoked by ATP and UTP in the aorta of P2Y2-deficient mice / P.J. Guns, T. Van Assche, P. Fransen, B. Robaye, J.M. Boeynaems, H. Bult // British Journal of Pharmacology. – 2006. – Vol. 147, №5. – P. 569-574.
83. Gutierrez-Fernandez, M. CDP-choline treatment induces brain plasticity markers expression in experimental animal stroke / M. Gutierrez-Fernandez, B. Rodríguez-Frutos, B. Fuentes et. al. // Neurochemistry International. – 2012. – Vol. 60, №3. – P. 310-317.
84. Han, B.H. Selective, reversible caspase3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain

injury / B.H. Han, D. Xu, J. Choi et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – №277. – P. 30128-30136.

85. Hazama, T. Evaluation of the effect of CDP-choline on poststroke hemiplegia employing a doubleblind controlled trial. Assessed by a new rating scale for recovery in hemiplegia / T. Hazama, T. Hasegawa, S. Ueda, A. Sakuma // International Journal of Neuroscience. – 1980. – №11. – P. 211-225.
86. Heiss, W.D. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? / W.D. Heiss // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2012. – Vol. 1268, №1. – P. 26-34.
87. Heiss, W.D. The ischemic penumbra / W.D. Heiss, R. Graf // Current Opinion in Neurology. – 1994. – Vol. 7, №1. – P. 11-19.
88. Hinkle, J.L. Acute Ischemic Stroke Review / J.L. Hinkle, M.M. Guanci // Journal Of Neuroscience Nursing. – 2007. – Vol. 39, №5. – P. 285-310.
89. Honda, K. Uridine as an active component of sleeppromoting substance: its effects on nocturnal sleep in rats / K. Honda, Y. Komoda, S. Nishida, H. Nagasaki, A. Higashi, K. Uchizono, S. Inoue // Neuroscience research. – 1984. – №1. – P. 243-252.
90. Honda, K. Sleep-promoting effects of intraperitoneally administered uridine in unrestrained rats / K. Honda, Y. Okano, Y. Komoda, S. Inoue // Neuroscience Letters. – 1985. – №62. – P. 137-141.
91. Hood, R. Peri-operative neurological complications / R. Hood, A. Budd, F.A. Sorond, C.W. Hogue // Anaesthesia. – 2018. – №73. – P. 67-75.
92. Horrocks, L.A. CDP-choline and CDP-ethanolamine prevent the release of free fatty acids during brain ischemia / L.A. Horrocks, R.V. Dorman, Z. Dabrowiecki, G. Goracci, G. Porcellati // Progress in Lipid Research. – 1981. – №20. – P. 531-534.
93. Hossmann, K.A. Glutamate hypothesis of stroke / K.A. Hossmann // Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie. – 2003. – Vol. 71, Suppl. 1. – P. 10-15.

94. Hossmann, K.A. Periinfarct depolarizations / K.A. Hossmann // Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews. – 1996. – Vol. 8, №3. – P. 195-208.
95. Hossmann, K.A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia / K.A. Hossmann // Annals of Neurology. – 1994. – Vol. 36. – P. 557-565.
96. Hurtado, O. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport / O. Hurtado, M.A. Moro, A. Cárdenas, V. Sánchez et. al. // Neurobiology of Disease. –2005. – Vol. 18, №2. – P. 336-345.
97. Inoue, K. P2Y(6)-Evoked Microglial Phagocytosis / K. Inoue, S. Koizumi, A. Kataoka, H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda // International Review of Neurobiology. – 2009. – №85. – P. 159-163.
98. Inoue, S. Sleep and sleep substances / S. Inoue // Brain & Development. –1986. – №8. – P. 469-473.
99. Jia, C. Activation of purinergic receptors induces proliferation and neuronal differentiation in Swiss Webster mouse olfactory epithelium / C. Jia, J.P. Doherty, S. Crudgington, C.C. Hegg // Neuroscience. – 2009. – № 163. – P. 120-128.
100. Kakihana, M. Effects of CDP-choline on neurologic deficits and cerebral glucose metabolism in a rat model of cerebral ischemia / M. Kakihana, N. Fukuda, M. Suno, A. Nagaoka // Stroke. – 1988. – Vol. 19, №2. – P. 217-222.
101. Kaminogo, M. Mild hypothermia on anoxic depolarization and subsequent cortical injury following transient ischemia / M. Kaminogo, A. Ichikura, M. Onizuka et. al. // Journal of Neurology Research. – 1999. – Vol. 21, №7. – P. 670-676.
102. Kashkoush, A.I. Perioperative stroke after cerebral aneurysm clipping: Risk factors and postoperative impact / A.I. Kashkoush, B.T. Jankowitz, C. Nguyen, P.A. Gardner, D.A. Wecht et. al. // Journal of Clinical Neuroscience. – 2017. – Vol. 44. – P. 188-195.

103. Kekesi, K.A. Concentration of nucleosides and related compounds in cerebral and cerebellar cortical areas and white matter of the human brain / K.A. Kekesi, Z. Kovacs, N. Szilagyi, M. Bobest, T. Szikra, A. Dobolyi, G. Juhasz, M. Palkovits // Cellular and Molecular Neurobiology. – 2006. – №26. – P. 833-844.
104. Kennedy, E.P. The synthesis of cytidine diphosphate choline, cytidine diphosphate ethanolamine, and related compounds / E.P. Kennedy // Journal of Biological Chemistry. – 1956. – Vol. 222, №1. – P. 185-191.
105. Kennedy, E.P. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids / E.P. Kennedy, S.B. Weiss // Journal of Biological Chemistry. – 1956. – Vol. 222. – P. 193-214.
106. Kim, H.J. Nucleotides released from fibrillar Aβ1-42-treated microglial cells increase cell migration and fibrillar Aβ1-42 uptake through P2Y2 receptor activation / H.J. Kim, D. Ajit, T.S. Peterson, Y. Wang, J.M. Camden et. al. // Journal of Neurochemistry. – 2012. – Vol. 121, №2. – P. 228-238.
107. Kimura, T. Possible existence of a novel receptor for uridine analogues in the central nervous system using two isomers, N3-(S)-(+)- and N3-(R)-(-)-alpha-hydroxy-betaphenethyluridines / T. Kimura, M. Miki, M. Ikeda, S. Yonemoto, K. Watanabe, S. Kondo, I.K. Ho, I.P. Yamamoto // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2001. – №24. – P. 729-731.
108. Kimura, T. The 6-azauridine analogues possessing sedative and hypnotic effects / T. Kimura, K. Watanabe, K. Miyamoto, S. Kondo, I. Yamamoto // Nucleic Acids Symposium Series. – 1992. – №27. – P. 199-200.
109. Kimura-Takeuchi, M. Lateral preoptic lesions void slowwave sleep enhanced by uridine but not by muramyl dipeptide in rats / M. Kimura-Takeuchi, S. Inoue // Neuroscience Letters. – 1993. – №157. – P. 17-20.
110. King, A.E. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets / A.E. King, M.A. Ackley, C.E. Cass, J.D. Young, S.A. Baldwin // Trends in Pharmacological Sciences. – 2006. – Vol. 27. – P. 416-425.

111. Koizumi, J. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area / J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa, G. Ooneda // Stroke. – 1986. – №8. – P. 1-8.
112. Koizumi, S. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis / S. Koizumi, Y. Shigemoto-Mogami, K. Nasu-Tada, Y. Shinozaki, K. Ohsawa, M. Tsuda et. al. // Nature. – 2007. – Vol. 446, №7139. – P. 1091-1095.
113. Kong, Q. Interleukin-1β enhances nucleotide-induced and a-secretase-dependent amyloid precursor protein processing in rat primary cortical neurons via up-regulation of the P2Y2 receptor / Q. Kong, T.S. Peterson T.S., O. Baker, E. Stanley, J. Camden, C.I. Seye, L. Erb, A. Simonyi, W.G. Wood, G.Y. Sun, G.A. Weisman // Neurochemistry. – 2009. – Vol. 109, №5. – P. 1300-1310.
114. Koshiba, M. Transient up-regulation of P2Y2 nucleotide receptor mRNA expression is an immediate early gene response in activated thymocytes / M. Koshiba, S. Apasov, V. Sverdlov, P. Chen, L. Erb, J.T. Turner, G.A. Weisman, M.V. Sitkovsky // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – Vol. 94, №3. – P. 831-836.
115. Koshigami, M. Central depressant effects of N3-substituted 6-azauridines in mice / M. Koshigami, K. Watanabe, T. Kimura, I. Yamamoto // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1991. – №39. – P. 2597-2599.
116. Koyuncuoglu, T. Uridine protects against hypoxic-ischemic brain injury by reducing histone deacetylase activity in neonatal rats / T. Koyuncuoglu, M. Turkyilmaz, B. Goren, M. Cetinkaya, M. Cansev, T. Alkan // Restorative neurology and neuroscience. – 2015. – Vol. 33, №5. – P. 777-784.
117. Krupinski, J. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat / J. Krupinski, I. Ferrer, M. Barrachina, J.J. Secades, J. Mercadal, R. Lozano // Neuropharmacology. – 2002. – Vol. 42, №6. – P. 846-854.

118. Krupinski, J. Citicoline inhibits MAP kinase signalling pathways after focal cerebral ischaemia / J. Krupinski, M. Slevin, L. Badimon // Neurochemical Research. – 2005. – Vol. 30, №8. – P. 1067-1073.
119. Kügelgen, I. Pharmacology and structure of P2Y receptors / I. Kügelgen, K. Hoffmann // Neuropharmacology. – 2016. – Vol. 104. – P. 50-61.
120. Lai, M.K. Selective loss of P2Y2 nucleotide receptor immunoreactivity is associated with Alzheimer's disease neuropathology / M.K. Lai, M.G. Tan, S. Kirvell, C. Hobbs, J. Lee, M.M. Esiri, C.P. Chen, P.T. Francis // Journal of Neural Transmission. – 2008. – Vol. 115, №8. – P. 1165-1172.
121. Lazarowski, E.R. Quantification of extracellular UDP-galactose / E.R. Lazarowski // Analytical Biochemistry. – 2010. – Vol. 396. – P. 23-29.
122. Lecca, D. Uracil nucleotides: From metabolic intermediates to neuroprotection and neuroinflammation / D. Lecca, S. Ceruti // Biochemical Pharmacology. – 2008. – Vol. 75. – P. 1869-1881.
123. Li, Z. Phosphatidylcholine and choline homeostasis / Z. Li, D.E. Vance // Journal of Lipid Research. – 2008. – Vol. 49, №6. – P. 1187-1194.
124. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons / P. Lipton // Physiological Reviews. – 1999. – № 79. – P. 1432-1568.
125. Liu, G.D. P2Y6 receptor and immunoinflammation / G.D. Liu, J.Q. Ding, Q. Xiao, S.D. Chen // Neuroscience Bulletin. – 2009. – Vol. 25, №3. – P. 161-164.
126. Liu, H. NOD2 is Involved in the Inflammatory Response after Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury and Triggers NADPH Oxidase 2-Derived Reactive Oxygen Species / H. Liu, X. Wei. L. Kong et. al. // International Journal of Biological Science. – 2015. – Vol. 11, №5. – P. 525-535.
127. Lo, E.H. Mechanism, Challenges and opportunities in stroke. Nature Reviews / E.H. Lo, T. Dalkara, M.A. Moskowitz // Neuroscience. – 2003. –№4. – P. 399-414.
128. Löffler, M. New perspectives on the roles of pyrimidines in the central nervous system / M. Löffler, E.A. Carrey, E. Zameitat // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. – 2018. – Vol. 37, №5. – P. 290-306.

129. Longa, E.Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats / E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins // Stroke. – 1989. – Vol. 20, №1. – P. 84-91.
130. Lowry, O.H. Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain / O.H. Lowry, J.V. Passonneau, F.X. Hasselberger, D.W. Schulz // Journal of Biological Chemistry. – 1964. – Vol. 239. – P. 18-30.
131. Marin, M.A. Stroke in CNS white matter: Models and mechanisms / M.A. Marin, S.T. Carmichael // Neurosci Lett. ¬¬¬¬¬– 2018. –¬¬ Vol. 684. –¬¬ P. 193-199.
132. Marler, J. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke / J. Marler // The New England Journal of Medicine. – 1995. – Vol. 333. – P. 1581-1588.
133. Martinet, M. Activation of soluble striatal tyrosine hydroxylase in the rat brain after CDPcholine administration / M. Martinet, P. Fonlupt, H. Pacheco // Biochem. Pharmacol. – 1981. – Vol. 30, №5. – P. 539-541.
134. Mass, M.B. Ischemic Stroke: Pathophysiology And Principles Of Localization. Hospital Physician Board Review Manual / M. B. Mass // Neurology. – 2009. – Vol. 13, №1. – P. 1-16.
135. Matyja, E. CDP-choline protects motor neurons against apoptotic changes in a model of chronic glutamate excitotoxicity in vitro / E. Matyja, A. Taraszewska, E. Nagańska, P. Grieb, J. Rafałowska // Folia Neuropathol. – 2008. –Vol. 46, №2. – P. 139.
136. McGraw, C.P. Experimental cerebral infarction effects of pentobarbital in Mongolian gerbils / C.P. McGraw // Arch. Neurol. – 1977. – Vol. 34, №6. – P. 334-336.
137. McMillan, T. The Glasgow Outcome Scale - 40 years of application and refinement / T. McMillan, L. Wilson, J. Ponsford, H. Levin, G. Teasdale, M. Bond // Nat Rev Neurol. – 2016. – Vol. 12, №8. – P. 477.

138. Mergenthaler, P. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models / P. Mergenthaler, U. Dirnagl, A. Meisel // Metab Brain Dis. – 2004. – Vol. 19, №3. – P.151-167.
139. Milani, M. Citicoline as coadiuvant treatment of cognitive impairment in chronic degenerative Central Nervous System diseases and in ischemic stroke: A review of available data / M. Milani // Online Journal of Medicine and Medical Science Research. – 2003. – Vol. 2, №2. – P. 13-18.
140. Millan, M. Fibrinolytic Therapy in Acute Stroke / M. Millan, L. Dorado, A. Davalos // Current Cardiology Reviews. – 2010. – Vol. 6, №3. – P. 218-226.
141. Mitchinson, M.J. The Hypotensive Stroke / M.J. Mitchinson // Lancet. – 1980. – Vol. 1, №8162. – P. 244-246.
142. Mitta, M. Edaravone-Citicoline Comparative Study In Acute Ischemic Stroke (ECCS-AIS) / M. Mitta, et al. // Journal of the Association of Physicians of India. – 2012. – Vol. 60. – P. 36-38.
143. Moore, D.J. Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study / D.J. Moore, J.K. Chambers, J.P. Wahlin, K.B. Tan, G.B. Moore, O. Jenkins, P.C. Emson, P.R. Murdock // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – № 1521(1-3). – P. 107-119.
144. Moore, D.J. GPR105, a novel Gi/o-coupled UDP-glucose receptor expressed on brain glia and peripheral immune cells, is regulated by immunologic challenge: possible role in neuroimmune function / D.J. Moore, P.R. Murdock, J.M. Watson, R.L. Faull, H.J. Waldvogel, P.G. Szekeres, S. Wilson, K.B. Freeman, P.C. Emson // Brain Res. Mol. Brain Res. – 2003. – № 118(1-2). – P. 10-23.
145. Morton, C.C. A mechanism for suppression of the CDP-choline pathway during apoptosis / C.C. Morton, A.J. Aitchison, K. Gehrig, N.D. Ridgway // J Lipid Res. – 2013. – Vol. 54. – P. 84.
146. Muir, K.W. Medical Management Of Stroke / K.W. Muir // Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. – 2001. – Vol. 70. – P.12-16.

147. Myers, C.S. Uridine potentiates haloperidol's disruption of conditioned avoidance responding / C.S. Myers, H. Fisher, G.C. Wagner // Brain Res. – 1994. – Vol. 651. – P.194-198.
148. Nagai, K. Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes / K. Nagai, K. Nagasawa, S. Fujimoto // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 334. – P. 1343-1350.
149. Namura, S. Activation And Cleavage Of Caspase-3 In Apoptosis Induced By Experimental Cerebral Ischemia / S. Namura, et al. // Journal of Neuroscience. – 1998. – Vol. 10. – P. 3659-3668.
150. Nedergaard, M. Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia / M. Nedergaard, A.J. Hansen // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1993. – Vol. 13. – P. 568-574.
151. Nicotera, P. Energy Requirement For Caspase Activation And Neuronal CellDeath / P. Nicotera, et al. // Brain Pathology. – 2000. – Vol. 10. – P. 276-282.
152. Obrenovitch, T.P. The ischaemic penumbra: twenty years on / T.P. Obrenovitch // Cerebrovasc Brain Metab. – 1995. – Rev 7. – P. 297-323.
153. O'Donnell, M.J. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study / M.J. O'Donnell, S.L. Chin, S. Rangarajan, D. Xavier, L. Liu, H. Zhang et al. // Lancet. – 2016. – Vol. 388(10046). – P. 761-775.
154. Ohno, K. Regional cerebral blood flow and stroke index after left carotid artery ligation in the conscious gerbil / K. Ohno, U. Ito, Y. Inaba // Brain Res. – 1984. – Vol. 297, №1. – P. 151-157.
155. Parihar, L. Pharmacological approaches and management of brain stroke / L. Parihar, S. Kumar, R. Gupta // International Journal of Research In Pharmacology And Pharmacotherapeutics. – 2014. –Vol. 3(4). – P. 335-348.
156. Paul, A. Critical Assessment Of Edaravone:An Effective Neuroprotective Therapy / A. Paul, et al. // Expert Opinion on Pharmacotherapy. – 2010. – Vol. 11(10) – P.1753-1763.

157. Paxinos, G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, C. Watson // San Diego: Academic Press. – 1998. – P. 237.
158. Pearce, A. The use of therapeutic magnesium for neuroprotection during global cerebral ischemiaassociated with cardiac arrest and cardiac surgery in adults: a systematic review / A. Pearce, C. Lockwood, C. Heuvel, J. Pearce // JBI Database System Rev Implement Rep. – 2017.– Vol. 15(1). – P. 86-118.
159. Pham-Huy, L. A. Free Radicals, Antioxidants In Disease And Health / L.A. Pham-Huy, et al. // International Journal of Biomedical Science. – 2008 – Vol. 4(2). – P. 89-96.
160. Piccoli, F. The brain nucleotide pattern of the rat after injection of uracil, uridine and uridine phosphate / F. Piccoli, R. Camarda, V. Bonavita // Acta Neurol. – 1971. – Vol. 26. – P. 109-117.
161. Plataras, C. Effect of CDPcholine on brain acetylcholinesterase and Na+/K+-ATPase in adult rats / C. Plataras, S. Taskiris, P. Angelogianni // Clin. Biochem. – 2000. – Vol. 33, №5. – P. 351-357.
162. Pooler, A.M. Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated PC12 / A.M. Pooler, D.H. Guez, R. Benedictus, R.J. Wurtman // Neuroscience. – 2005. – Vol. 134. – P. 207-214.
163. Rafehi, M. Tools and drugs for uracil nucleotide-activated P2Y receptors / M. Rafehi, C.E. Müller // Pharmacol Ther. – 2018. – Vol. 190. – P. 24-80.
164. Raffa, G.M. Neurological complications after cardiac surgery: a retrospective case-control study of risk factors and outcome / G.M. Raffa, F. Agnello, G. Occhipinti, R. Miraglia, V. Lo Re, G. Marrone, et al. // J Cardiothorac Surg. – 2019. – Vol. 14(1). – P. 23.
165. Rao, A.M. CDP-choline: neuroprotection in transient forebrain ischemia of gerbils / A.M. Rao., J.F. Hatcher, R.J. Dempsey // J Neurosci Res. –1999. – Vol. 58(5). – P. 697-705.
166. Ricarte, I.F. Symptomatic Cerebral Vasospasm and Delayed Cerebral Ischemia Following Transsphenoidal Resection of a Craniopharyngioma / I.F. Ricarte,

B.F. Funchal, M.A. Miranda Alves, D.L. Gomes, R.A. Valiente, F.A. Carvalho, G.S. Silva // J Stroke Cerebrovasc Dis. – 2015. – Vol. 24(9). – P. 271-273.

167. Rieg, T. P2Y2 receptor activation decreases blood pressure and increases renal Na+ excretion / T. Rieg, M. Gerasimova, J.L. Boyer, P.A. Insel, V. Vallon // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2011. – № 301(2). – P. 510-518.
168. Ritzel, M.W. Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na+/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine / M.W. Ritzel, S.Y. Yao, A.M. Ng, J.R. Mackey, C.E Cass, J.D. Young // Mol. Membr. Biol. – 1998. – Vol. 15. – P. 203-211.
169. Roberts, C.A. Uridine anticonvulsant effects: selective control of nucleoside incorporation in experimental epilepsy / C.A. Roberts, N.R. Kreisman, M. Waltman // Epilepsia. – 1974. – Vol. 15. – P. 479-500.
170. Rodrigues, R.J. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus / R.J. Rodrigues, T. Almeida, P.J. Richardson, C.R. Oliveira, R.A. Cunha // J. Neurosci. – 2005. – №25(27). – P. 6286-6295.
171. Rodríguez-Zayas, A.E. P2Y2 receptor expression is altered in rats after spinal cord injury / A.E. Rodríguez-Zayas, A.I. Torrado, J.D. Miranda // Int. J. Dev. Neurosci. – 2010. – №28(6). – P. 413-421.
172. Rose, J. B. Physiology of nucleoside transporters: back to the future / J. B.Rose, I. R. Coe // Physiology (Bethesda). – 2008. – Vol. 23. – P. 41-48.
173. Rudkin, S. Imaging of acute ischemic stroke / S. Rudkin, R. Cerejo, A. Tayal, M.F. Goldberg // Emerg Radiol. – 2018. – Vol. 25(6). – P. 659-672.
174. Sahin, S. Effects of citicoline used alone and in combination with mild hypothermia on apoptosis induced by focal cerebral ischemia in rats / S. Sahin, T. Alkan, S.G. Temel, K. Tureyen, S. Tolunay, E. Korfali // J Clin Neurosci. – 2010. – Vol. 17(2). – P. 227-231.

175. Sakamoto, T. Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus / T. Sakamoto, M. Cansev, R. J. Wurtman // Brain Res. – 2007. – Vol. 1182. – P. 50-59.
176. Saver, J.L. Citicoline:Update on a promising and wildly available agent for neuroprotection and neurorepair / J.L. Saver // Rev.in neurology, disease. – 2008. – Vol. 5, №4. – P. 167-177.
177. Saver, J.L. Target brain: neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke / J.L. Saver // Rev Neurol Dis. – 2010. –Vol. 7.– P. 14-21.
178. Schallert, T. Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage / T. Schallert, M. Upchurch, N. Lobaugh, S.B. Farrar, W.W. Spirduso, P. Gilliam, D. Vaughn, R.E. Wilcox // PharmacolBiochemBehav. – 1982. – Vol. 16(3). – P. 455-462.
179. Schrader, A.M. P2Y2 nucleotide receptor up-regulation in submandibular gland cells from the NOD B10 mouse model of Sjogren's syndrome / A.M. Schrader, J.M. Camden, G.A. Weisman // Arch. Oral Biol. – 2005. – № 50(6). – P. 533-540.
180. Secades, J.J. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2016 update / J.J. Secades // Rev Neurol. – 2016. – P. 1-73.
181. Seye, C.I. Functional P2Y2 nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries / C.I. Seye, Q. Kong, L. Erb, R.C. Garrad, B. Krugh, M. Wang, J.T. Turner, M. Sturek, F.A. Gonzalez, G.A. Weisman // Circulation. – 2002. – № 106(21). – P. 2720-2726.
182. Shen, J. Cloning, up-regulation, and mitogenic role of porcine P2Y2 receptor in coronary artery smooth muscle cells / J. Shen, C.I. Seye, M. Wang, G.A. Weisman, P.A. Wilden, M. Sturek // Mol. Pharmacol. – 2004. – № 66(5). – P. 1265-1274.

183. Shichita, T. Noval Therapeutic Strategies Targeting Innate Immune Responses AndEarly Inflammation After Stroke / T. Shichita, et al. // Journal of Neurochemistry. – 2012. – Vol. 123(2). – P. 29-38.
184. Shirley, R. Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke / R. Shirley, et al. // Antioxidants. – 2014. – Vol. 3(3). – P. 472-501.
185. Sicard, K.M. Animal models of focal brain ischemia / K.M. Sicard, M. Fisher // Exp Transl Stroke Med. – 2009. – Vol.13. – P. 1-7.
186. Simard, M. Signaling at the gliovascular interface / M. Simard, G. Arcuino, T. Takano, Q.S. Liu, M. Nedergaard // J. Neurosci. – 2003. – № 23(27). – P. 9254-9262.
187. Sobolewski, P. Intravenous thrombolysis with rt-PA for acute ischemic stroke within 24h of a transient ischemic attack / P. Sobolewski, et al. // Journal of the Neurological Sciences. – 2014. –Vol. 340. – P. 44-49.
188. Sommer, C.J. Ischemic stroke: experimental models and reality / C.J. Sommer // Acta Neuropathol. – 2017. – Vol. 133(2). – P. 245-261.
189. Sonoda, T. Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice / T. Sonoda, M. Tatibana // Biochim. Biophys. Acta. ¬– 1978. – Vol. 521. – P. 55-66.
190. Stankowski, J.N. Therapeutic Targets for Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke: Lost in Translation / J.N. Stankowski, R. Gupta // Antioxidant & Redox Signaling. – 2011. – Vol. 14(10). – P. 1841-1851.
191. Stoll, G. Molecular Mechanisms of Thrombus Formation In Ischemic Stroke: Novel Insights And Targets For Treatment / G. Stoll, C. Kleinschnitz, B. Nieswandt // Blood. – 2008. – Vol. 112(9). – P. 3555-3562.
192. Stoner, K.E. Volume of Brain Herniation in Patients with Ischemic Stroke After Decompressive Craniectomy / K.E. Stoner, K.O. Abode-Iyamah, N.M. Grosland, M.A. Howard // World Neurosurg. – 2016. – Vol. 96. – P. 101-106.
193. Tang, K.S. The protective mechanisms of polydatin in cerebral ischemia / K.S. Tang, J.S. Tan // Eur J Pharmacol. – 2019. – Vol. 842. – P. 133-138.

194. Tazaki, Y. Treatment of acute cerebra infarction with a choline precursor in a multicenter double–blind placebo–controlled study / Y. Tazaki // Stroke. – 1988. – Vol. 19. – P. 211-216.

195. Teather, L.A. Chronic administration of UMP ameliorates the impairment of hippocampal-dependent memory in impoverished rats / L.A. Teather, R.J. Wurtman // J. Nutr. – 2006. – Vol. 136. – P. 2834-2837.

196. Teather, L.A. Dietary CDP-choline supplementation prevents memory impairment caused by impoverished environmental conditions in rats / L.A. Teather, R.J. Wurtman // Learn. Mem. – 2005. – Vol. 12. – P. 39-43.

197. Teather, L.A. Dietary cytidine (5') diphosphocholine supplementation protects against development of memory deficits in aging rats / L.A. Teather, R.J. Wurtman // Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry. –2003. – Vol. 27. – P. 711-717.

198. Tehse, J. The overlooked aspect of excitotoxicity: Glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injurie / J. Tehse, C. Taghibiglou // Eur J Neurosci. – 2019. – Vol. 49(9). – P. 1157-1170.

199. Thrift, A.G. Global stroke statistics: An update of mortality data from countries using a broad code of "cerebrovascular diseases" / A.G. Thrift, G. Howard, D.A. Cadilhac, V.J. Howard, P.M. Rothwell, T. Thayabaranathan, V.L. Feigin, B. Norrving, G.A. Donnan // Int J Stroke. – 2017. – Vol. 12(8). – P. 796-801.

200. Tornos, M.E. Pharmacological study of CDP-choline. Protection against toxicity in a model of experimental hypoxia / M.E. Tornos, A. Sacristán A., J.A. Ortiz // Arzneimittelforschung. – 1983. – Vol. 33(7A). – P. 1022-1024.

201. Traut, T.W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines / T.W. Traut // Molecular and cellular biochemistry. – 1994. – Vol. 140. – P. 1-22.

202. Trovarelli, G. The influence of CDP-choline on brain lipid metabolism during ischemia / G. Trovarelli, G.E. De Medio, I. Montanini // Farmaco Sci. – 1982. – Vol. 37(10). – P. 663-668.

203. Turner, J.T. Upregulation of P2Y2 nucleotide receptors in rat salivary gland cells during short-term culture / J.T. Turner, G.A. Weisman, J.M. Camden // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 273(3). – P. 1100-1107.
204. Udesh, R. Perioperative strokes following surgical correction of mitral valves: A Systematic Review and Meta-Analysis / R. Udesh, P. Natarajan, V. Jeevanantham, T.G. Gleason, V. Badhwar, P.D. Thirumala / European Neurology. – 2017. – Vol. 78(1-2). – P. 63-70.
205. Wang-Fischer, Y. Manual of Stroke Models in Rats / Y. Wang-Fischer // Taylor & Francis Group. – 2017. – 352 p. ISBN 084939578
206. Wardlaw, J.M. Recombinant Tissue Plasminogen Activator For Acute Ischaemic Stroke: An Updated Systematic Review And Meta-Analysis / J.M. Wardlaw, et. al. // The Lancet. – 2012. – Vol. 379(9834). – P. 2364-2372.
207. Waring, W.S. Uric acid: An Important Antioxidant In Acute Ischaemic Stroke / W.S. Waring, et. al. // The Quarterly journal of medicine. – 2002. – Vol. 95. – P. 691-693.
208. Weisman, G.A. P2Y receptors in the mammalian nervous system: pharmacology, ligands and therapeutic potential / G.A. Weisman, L.T. Woods, L. Erb, C.I. Seye // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2012. – Vol. 11(6). – P. 722-738.
209. Wright, J. Glasgow Outcome Scale – Extended // Encyclopedia of Clinical Neuropsychology / Kreutzer J. S., DeLuca J., Caplan B. eds. – New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer Science+Business Media. – 2011. – ISBN 978-0-387-79947-6.
210. Wu, L. Oligemia, Penumbra, Infarction: Understanding Hypoperfusion with Neuroimaging / L. Wu, W. Wu, E.T. Tali, W.T. Yuh // Neuroimaging Clin N Am. – 2018. – Vol. 28(4). – P. 599-609.
211. Wurtman, R.J. Synapse formation is enhanced by oral administration of uridine and DHA, the circulating precursors of brain phosphatides / R.J. Wurtman, M. Cansev, I.H. Ulus // J. Nutr. Health Aging. – 2009. – Vol. 13. – P. 189-197.

212. Wurtman, R.J. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans / R.J. Wurtman, M. Regan, I. Ulus, L. Yu // Biochem Pharmacol. – 2000. – Vol. 60(7). – P. 989-992.
213. Wurtman, R.J. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans / R.J. Wurtman, M. Regan, I. Ulus, L. Yu // Biochem Pharmacol. – 2000. – Vol. 60(7). – P. 989-992.
214. Yamaguchi, T. Ebselen in acute ischemic stroke:a placebo-controlled, double blind clinical trial / T. Yamaguchi // Stroke. – 1998. – Vol. 29(1). – P. 12-17.
215. Yamamoto, I. Nsubstituted oxopyrimidines and nucleosides: structure-activity relationship for hypnotic activity as central nervous system depressant / I. Yamamoto, T. Kimura, Y. Tateoka, K. Watanabe, I.K. Ho // J. Med. Chem. – 1987. – Vol. 30. – P. 2227-2231.
216. Yamamoto, I. N3-benzyluridine exerts hypnotic activity in mice / I. Yamamoto, T. Kimura, Y. Tateoka, K. Watanabe, I.K. Ho // Chem. Pharm. Bull. – 1985. – Vol. 33. – P. 4088-4090.
217. Yamamoto, I. The potent depressant effects of N3-phenacyluridine in mice / I. Yamamoto, J. Kuze, T. Kimura, K. Watanabe, S. Kondo, I.K. Ho // Biol. Pharm. Bull. – 1994. – Vol. 17 – P. 514-516.
218. Zaleska, M.M. The development of stroke therapeutics: promising mechanisms and translational challenges / M.M. Zaleska, M.L. Mercado, J. Chavez, G.Z. Feuerstein, M.N. Pangalos, A. Wood // Neuropharmacology. – 2009. – Vol. 56. – P. 41.
219. Zandieh, A. A simple risk score for early ischemic stroke mortality derived from National Institutes of Health Stroke Scale: A discriminant analysis / A. Zandieh, Z.Z. Kahaki, H. Sadeghian, M. Fakhri, M. Pourashraf, S. Parviz, M. Ghaffarpour, M. Ghabaee // Clinical Neurology and Neurosurgery. – 2013. – Vol. 115. – P. 1036-1039.
220. Zauner, A. Brain oxygenation and energy metabolism / A. Zauner, W.P. Daugherty, M.R. Bullock, D.S. Warner // Neurosurgery. – 2002. – Vol. 51. – P. 289-301.

221. Zhang, J. Uridine binding and transportability determinants of human concentrative nucleoside transporters / J. Zhang, K.M. Smith, T. Tackaberry, F. Visser, M.J. Robins, L.P. Nielsen, I. Nowak, E. Karpinski, S.A. Baldwin, J.D. Young, C. E. Cass // Mol. Pharmacol. – 2005. – Vol. 68. – P. 830-839.
222. Zhao, Q. Effects of uridine on kindling / Q. Zhao, T. Shatskikh, A. Marolewski, J.R. Rusche, G.L. Holmes // Epilepsy Behav. – 2008. – Vol. 13. – P. 47-51.
223. Zhou, Z. Antiplatelet strategy for acute ischemic stroke: A mini review / Z. Zhou, H. Chen // World Journal of Neurology. – 2013. – Vol. 3(4). – P. 144-147.
224. Zonta, M. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation / M. Zonta, M.C. Angulo, S. Gobbo, B. Rosengarten, K.A. Hossmann, T. Pozzan, G. Carmignoto // Nat. Neurosci. – 2003. – № 6(1). – P. 43-50.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	–	аденозиндифосфат
АТФ	–	аденозинтрифосфат
АТФаза	–	аденозинтрифосфатаза
БЭА	–	биоэлектрическая активность
ВСА	–	внутренняя сонная артерия
ГЭБ	–	гематоэнцефалический барьер
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛМК	–	локальный мозговой кровоток
НСА	–	наружная сонная артерия
ОСА	–	общая сонная артерия
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
СМА	–	средняя мозговая артерия
УДФ	–	уридиндифосфат
УПП	–	уровень постоянного потенциала
УТФ	–	уридинтрифосфат
ЦДФ-холин	–	цитидин-5-дифосфохолин
ЦДФ	–	цитидиндифосфат
ЦНС	–	центральная нервная система
ЦОГ	–	циклооксигеназа
ЦТФ	–	цитидин- 5′-трифосфат
ЭЭГ	–	электроэнцефалограмма
Cys-LT	–	цистеинил-лейкотриены
GABA	–	гамма-аминомасляная кислота
IL	–	интерлейкин
NMDA	–	N-метил-D-аспартат
NO	–	оксид азота
NSE	–	нейроспецифическая енолаза
RNS	–	активные формы азота
ROS	–	активные формы кислорода