

УДК 577.112.6:615.214.31

# Дипептидный миметик фактора роста нервов стимулирует нейрогенез и синаптогенез в гиппокампе и стриатуме взрослых крыс с фокальной церебральной ишемией

Т. А. Гудашева\*, П. Ю. Поварнина, А. А. Волкова, С. В. Круглов, Т. А. Антипова, С. Б. Середенин

Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, 125315, Москва, Балтийская ул., 8

\*E-mail: gudasheva@academpharm.ru

Поступила в редакцию 05.04.2019

Принята к печати 06.06.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-31-37

**РЕФЕРАТ** Фактор роста нервов (NGF, nerve growth factor) и его миметики, обладающие нейропротекторными и нейрорегенеративными свойствами, привлекают внимание как объекты для разработки новых средств терапии последствий поражений головного мозга. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова создан дипептидный миметик 4-й петли NGF – гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (ГК-2), который, подобно полноразмерному NGF, активирует TrkA-рецепторы, но, в отличие от него, активирует преимущественно путь PI3K/АКТ, ассоциированный с нейропротекцией, и не стимулирует каскад MAPK, связанный с основным побочным эффектом нейротрофина – гиперальгезией. Нейропротекторная активность ГК-2 выявлена на различных моделях церебральной ишемии. В условиях экспериментального инсульта ГК-2 статистически значимо снижает объем инфаркта мозга даже при введении через 24 ч после повреждения, что свидетельствует в пользу нейрорегенеративных свойств ГК-2, которые могут быть связаны с активацией нейрогенеза и/или синаптогенеза. Нами изучено влияние ГК-2 на нейрогенез и синаптогенез в условиях экспериментального ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией среднечерепной артерии у крыс. ГК-2 начинали вводить через 6 и 24 ч после операции, а затем вводили 1 раз в сутки в течение 7 дней. Через сутки после последнего введения препарата оценивали пролиферативную активность в гиппокампе и стриатуме поврежденного полушария по уровню Ki67, синаптогенез по уровню синаптофизина и PSD-95 в стриатуме. Установлено, что иммунореактивность к Ki67 как в стриатуме, так и в гиппокампе ишемизированных крыс снижена примерно на 30% по сравнению с ложнооперированным контролем. Содержание синаптических маркеров синаптофизина и PSD-95 было также статистически значимо снижено – на 14 и 29% соответственно. ГК-2 при обоих режимах введения полностью восстанавливал уровень иммунореактивности к Ki67 в гиппокампе и вызывал тенденцию к ее увеличению в стриатуме. Кроме того, ГК-2 восстанавливал содержание постсинаптического маркера PSD-95 с терапевтическим эффектом 70% при начале его введения через 6 ч после инсульта, вызывал тенденцию к восстановлению уровня этого маркера при начале введения через 24 ч. Влияние ГК-2 на уровень синаптофизина не выявлено. Полученные данные позволяют сделать вывод о стимулирующем влиянии миметика нейротрофина ГК-2, активирующего преимущественно один из основных сигнальных путей Trk-рецепторов, PI3K/АКТ, на нейрогенез (и, возможно, глиогенез) и синаптогенез в условиях экспериментальной церебральной ишемии. Этой стимуляцией можно объяснить защитное действие дипептида при начале его введения через 24 ч после моделирования инсульта.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** NGF, дипептидный миметик ГК-2, инсульт, нейрогенез, синаптогенез, Ki67, PSD-95, синаптофизин.

**ВВЕДЕНИЕ**

Разработка методов патогенетической терапии ишемического инсульта после реперфузии остается актуальной задачей современной медицины.

В качестве нейропротектора внимание исследователей привлекает фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), способный влиять на основные механизмы ишемического повреждения нейронов: глутаматную токсичность, опосредующую избыточное поступление кальция в клетку [1], окислительный стресс [2]. NGF снижает экспрессию проапоптотических белков, активирует синтез антиапоптотических белков [3, 4]. Экспериментально доказана вовлеченность NGF в процессы нейрогенеза во взрослом мозге грызунов. NGF увеличивает пролиферацию нейрональных стволовых клеток, способствует выживаемости прогениторных клеток и стимулирует дифференцировку нейробластов в обеих основных нейрогенных зонах – субвентрикулярной зоне и в зубчатой извилине гиппокампа [5–9]. Эффективность NGF при внутримозговом и интраназальном введении показана на различных моделях церебральной ишемии у грызунов. Чрезвычайно важно, что нейротрофин сохранял активность при отставленном начале введения – через 24 ч после моделирования инсульта [6, 10]. Применение NGF в клинике ограничено не только его неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами, но и серьезными, обусловленными плеiotропностью побочными эффектами, основные из которых – гипералгезия, катастрофическая потеря веса, избыточный нейритогенез и ангиогенез [11]. Не исключено, что недостатки полноразмерного белка NGF могут быть преодолены созданием его низкомолекулярных миметиков, обладающих селективным фармакологическим действием [12].

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова разрабатывает гипотезу, в соответствии с которой распознавание рецептором и связывание определяются наиболее экспонированными участками петлеобразных структур нейротрофинов, чаще всего центральными участками их бета-изгибов, причем миметики бета-изгибов разных петель могут имитировать разные функции нейротрофина [13]. На основе этой гипотезы создан димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF – гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-L-глутамил-L-лизина), получивший лабораторный шифр ГК-2 [Патент РФ № 2410392, 2010; Патент США US 9,683,014 B2; Патент КНР CN 102365294 B, 2016]. Установлено, что ГК-2, подобно NGF, активирует TrkA-рецепторы, но, в отличие от полноразмерного белка, активирует преимущественно PI3K/AKT-путь, ассоциированный с нейропротекцией, не вызывая стимуляции MAPK-каскада, опосредующего гипералгезию [14].

Исследования *in vitro* показали, что ГК-2, подобно NGF, обладает нейропротекторной активностью в микронаномолярных концентрациях в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности на культурах как иммортализованных, так и первичных нейронов [15]. Нейропротекторную активность ГК-2 показал и *in vivo* при системном введении на моделях болезней Альцгеймера и Паркинсона, а также на различных моделях церебральной ишемии [16]. В подтверждение данных *in vitro* ГК-2, в отличие от полноразмерного белка, не вызывал гипералгезии и потери веса в экспериментах *in vivo* [14]. Изучение нейропротекторного эффекта ГК-2 на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией среднемозговой артерии у крыс, показало, что дипептид статистически значимо снижает объем повреждения мозга при начале терапевтического введения от 4 до 24 ч с наибольшим эффектом (60%) при первом введении через 6 ч после операции [17]. Сохранение активности ГК-2 при начале его введения через 24 ч после моделирования ишемического инсульта не объясняется, вероятно, нейропротекторными свойствами соединения, поскольку зона инфаркта к этому времени уже полностью сформирована [18]. Поэтому логично полагать, что по прошествии 24 ч от возникновения ишемии протекторное действие ГК-2 может быть связано с его регенеративными свойствами.

С целью выяснения этого вопроса нами изучено влияние ГК-2 на нейрогенез и синаптогенез в условиях экспериментального ишемического инсульта с использованием антител к маркеру пролиферации Ki67 и маркерам синаптогенеза – синаптофизину и PSD-95. Показатели нейрогенеза и синаптогенеза определяли в гиппокампе и стриатуме. Выбор этих структур обусловлен тем, что в гиппокампе локализована одна из основных нейрогенных зон взрослого мозга (субгранулярная зона), а стриатум является структурой, наиболее подверженной повреждению при окклюзии среднемозговой артерии [6]. Эффекты ГК-2 изучали при начале его введения через 6 и 24 ч после моделирования инсульта.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ****Животные**

В опытах использовали 34 крыс-самцов линии Вистар массой 220–250 г и возрастом 8–9 недель на момент начала эксперимента, полученных из Филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦВМТ» ФМБА России массой 210–240 г. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. При работе со-

блюдали требования, сформулированные в Приказе Минздрава РФ № 199 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и в Решении Совета ЕЭК № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». Все манипуляции с животными одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова.

### Моделирование ишемического инсульта

Ишемический инсульт моделировали внутрисосудистым перекрытием среднелобной артерии нитью [19]. Все хирургические манипуляции осуществляли с помощью титановых микрохирургических инструментов. Крыс вводили в наркоз 5% раствором хлоралгидрата (350 мг/кг, в/б). Выполняли срединный разрез в области шеи и выделяли с правой стороны шеи сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально – грудно-ключично-сосцевидной мышцей и медиально – грудно-подъязычной мышцей. В сонном треугольнике выделяли сонный сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом. Осторожно отделяли блуждающий нерв и накладывали микрохирургическую сосудистую титановую клипсу на общую сонную артерию на 1.5 см ниже ее бифуркации. Аккуратно выделяли из спаек наружную и внутреннюю сонные артерии. На внешнюю сонную артерию накладывали хлопчатобумажную нить, плотно затягивали. На внутреннюю сонную артерию накладывали викриловую нить, затягивали не плотно, после чего перерезали внешнюю сонную артерию проксимальнее наложения нити. Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0.25 мм вводили через культю внешней сонной артерии во внутреннюю сонную артерию на глубину 19–21 мм (до перекрытия среднелобной артерии) и фиксировали микрососудистой клипсой. Перекрытие кровотока осуществляли в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне среднелобной артерии. После извлечения нити культю внешней сонной артерии закрывали коагуляцией электрокаутером до полной герметичности. Ложнооперированных животных подвергали тем же процедурам за исключением перерезания сосудов и введения нити. Срединный разрез шеи зашивали хлопчатобумажными нитями и обрабатывали стрептоцидом. Объем ишемического повреждения на 7-е сут после моделирования инсульта в наших экспериментах составлял 700–800 мм<sup>3</sup> (по результатам морфометрии срезов мозга, окрашенных хлоридом 2,3,5-трифенилтетразолия) [17].



Рис. 1. Схема эксперимента. МСАО – окклюзия среднелобной артерии

### Дизайн исследования

Оперированных животных произвольным образом делили на три группы – группа «инсульт» (оперированные нелеченные животные;  $n = 9$ ) и две группы, получавшие ГК-2 (1 мг/кг, в/б), разведенный в воде для инъекций. ГК-2 вводили из расчета 2 мл на килограмм массы тела через 6 ( $n = 10$ ) или 24 ч ( $n = 7$ ) после операции, а затем 1 раз в сутки, окончание введения – на 6-е сут после операции. Животные из групп «инсульт» и «ложная операция» ( $n = 8$ ) получали в том же режиме воду для инъекций. На 7-е сут после операции крыс декапитировали, головной мозг извлекали при температуре 0–4°C и выделяли из поврежденного полушария стриатум и гиппокамп, которые затем замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

### Оценка пролиферативной активности и синаптогенеза

Влияние ГК-2 на пролиферативную активность и синаптогенез в стриатуме и гиппокампе оценивали с помощью Вестерн-блот-анализа [20]. После размораживания образцы тканей животных одной группы объединяли так, чтобы получилось не менее трех проб. После этого пробы гомогенизировали при температуре 4°C в стеклянном гомогенизаторе с лизирующим буфером (50 мМ Трис-НСl, 5 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 1% тритона X-100, pH 7.5), содержащим коктейль ингибиторов протеаз (пепстатин, бестатин, лейпептин и апротинин Sigma-Aldrich, США), отношение ткань : буфер = 1 : 10 (вес/объем). Затем инкубировали в течение 20 мин при 4°C и центрифугировали (20 мин при 15000 об/мин, центрифуга Allegra® X-12R BeckmanCoulterInc., США) при той же температуре. Концентрацию белка в супернатанте определяли по методу Фолина–Лоури [21]. Белки супернатанта разделяли в 12% полиакриламидном геле и переносили на мембрану из поливинилиденфторида электроослюцией. Затем мембраны инкубировали в Трис-НСl-буфере (200 мМ, pH 7.5),

содержащем 1% Твина-20 (TBST) и 5% (вес/объем) обезжиренного молока, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембраны в течение 1.5 ч инкубировали при комнатной температуре с первичными моноклональными антителами против синаптофизина (BD Biosciences, Великобритания) в разведении 1:5000, первичными моноклональными антителами против PSD-95 (Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:1000, первичными поликлональными антителами против Ki67 (Thermo Fisher Scientific) в разведении 1:5000, избыток антител отмывали TBST с 0.5% (вес/объем) обезжиренным молоком, мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными козыми антителами против IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology, США, 1:2000), конъюгированными с пероксидазой хрена. Белки выявляли после отмывки от вторичных антител в TBST в реакции с реагентами-усилителями хемилюминесценции (ECL-реагенты, Santa Cruz Biotechnology) с использованием гелъ-документирующей системы Alliance Q9 (UVITEC, Великобритания). Изображения денситометрировали с помощью программы GIMP2.

### Статистическая обработка

Межгрупповые различия оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Данные представляли в форме средних и стандартных отклонений.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 7 дней после операции иммунореактивность к маркеру пролиферации Ki67 как в стриатуме, так и в гиппокампе ишемизированного головного мозга крыс, не получавших ГК-2, оказалась снижена примерно на 30% по сравнению с ложнооперированным контролем (рис. 2, 3). Семидневное введение ГК-2 ишемизированным животным привело не только к восстановлению уровня иммунореактивности к маркеру Ki67 в гиппокампе, но и к превышению ее исходных значений на 35 и 36% при 6- и 24-часовом интервале между операцией и первым введением пептида соответственно (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о способности миметика NGF стимулировать пролиферативную активность в гиппокампе ишемизированного мозга. Исходя из ранее полученных данных об улучшении неврологического статуса крыс при введении ГК-2 (начало введения через 6 и 24 ч после операции) в таких же условиях, как в нашем эксперименте [17], мы можем предположить, что стимуляция пролиферативной активности под действием дипептида приводит, по крайней мере преимущественно, к нейрогенезу. В пользу этого свидетельствуют также опубликованные данные о том,

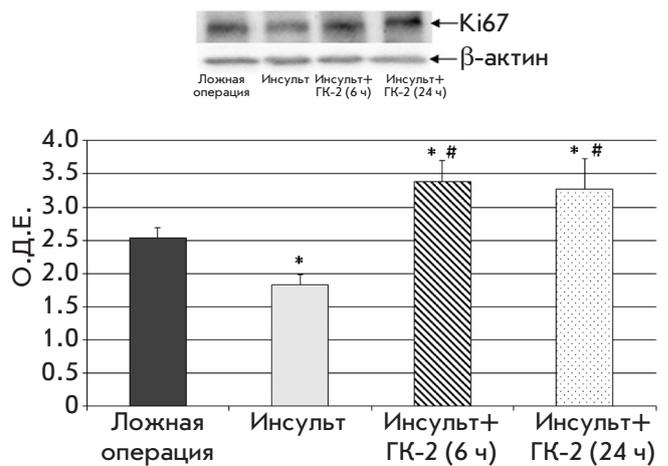


Рис. 2. Влияние ГК-2 на содержание маркера пролиферации Ki67 в гиппокампе при субхроническом (7 дней) введении (1 мг / кг, в / б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, в условиях терапевтического окна 6 и 24 ч (время между операцией и первым введением препарата). О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «ложная операция», # –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «инсульт» (U-тест Манна–Уитни)

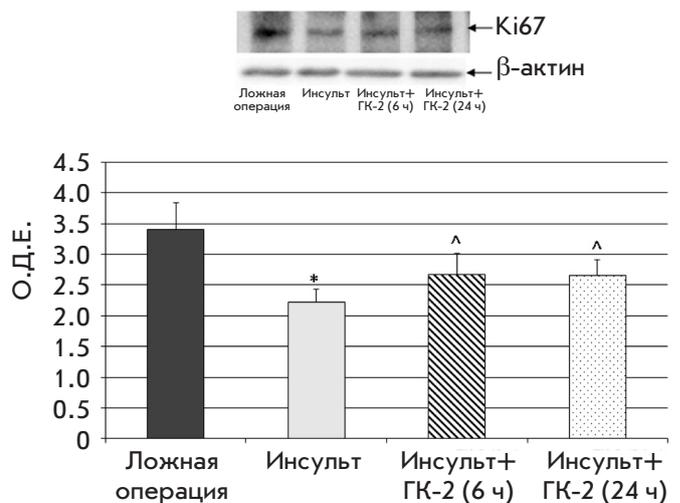


Рис. 3. Влияние ГК-2 на содержание маркера пролиферации Ki67 в стриатуме крыс при субхроническом (7 дней) введении (1 мг / кг, в / б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии, в условиях терапевтического окна 6 и 24 ч (время между операцией и первым введением препарата). О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «ложная операция», ^ –  $p < 0.1$  по сравнению с группой «инсульт» (U-тест Манна–Уитни)

что полноразмерный NGF стимулирует гиппокампальный нейрогенез, увеличивая пролиферативную активность и способствуя выживаемости нейробластов в зубчатой извилине гиппокампа [5, 9].

Таким образом, мы можем сделать предварительный вывод о том, что ГК-2 воспроизводит эффекты NGF, увеличивая гиппокампальный нейрогенез в условиях церебральной ишемии. В меньшей степени можно предположить влияние ГК-2 на глиогенез, поскольку даже полноразмерный нейротрофин стимулирует в основном образование нейробластов.

В стриатуме ГК-2 при обоих режимах введения вызывал тенденцию к повышению уровня иммунореактивности к Ki67 примерно в 1.2 раза по сравнению с нелечеными животными (что соответствует терапевтическому эффекту 36–37% ( $p = 0.08$ )) (рис. 3). Известно, что в условиях окклюзии средней мозговой артерии NGF стимулирует пролиферативную активность и увеличивает выживаемость нейробластов в субвентрикулярной зоне и в стриатуме крыс [6, 10]. На такой же модели ишемии мозга с помощью маркера пролиферации BrdU показано [6], что NGF при интраназальном введении способствует увеличению выживаемости прогениторных клеток в стриатуме через 4 недели примерно в 1.5 раза. С использованием другого маркера пролиферации, Ki67, установлено [10], что NGF, экспрессированный в мозге крыс с помощью лентивирусного вектора, также стимулирует нейрогенез в поврежденном стриатуме, увеличивая примерно в 2 раза число нейробластов по сравнению с нелечеными животными через 3 недели после моделирования инсульта.

Таким образом, ГК-2, введенный системно, по видимому, оказывает сходное с NGF, введенным внутрь мозга интраназально или с помощью генной терапии, действие на нейрогенез в стриатуме ишемизированных крыс.

В настоящее время накоплено большое количество экспериментальных данных, указывающих на компенсаторную роль нейрогенеза в субвентрикулярной и субгранулярной зонах в условиях церебральной ишемии [22]. Согласно опубликованным данным, в патологических условиях нейрогенез активируется, при этом вновь образовавшиеся нейробласты мигрируют в поврежденные области мозга, где замещают погибшие нейроны [23]. Поэтому можно предположить, что стимулирующее влияние ГК-2 на пролиферативную активность в гиппокампе приводит к активации нейрорегенеративных процессов в зоне ишемического повреждения за счет миграции в эту область большего числа выживших нейрональных клеток-предшественников и, в конечном итоге, к их интеграции. Вероятно, что тенденция к увеличению уровня маркера пролиферации Ki67 в стриатуме

под действием ГК-2 обусловлена миграцией в эту область нейробластов из нейрогенных зон.

Оценка уровня синаптических маркеров в стриатуме поврежденного полушария ишемизированных крыс показала, что содержание как белка постсинаптической плотности PSD-95, так и пресинаптического белка синаптофизина, было статистически значимо снижено по сравнению с ложнооперированными животными (соответственно на 29 и 14%) (рис. 4, 5). Эти результаты подтверждают наличие ишемического повреждения в данной области, связанного с потерей нейронов и синапсов. ГК-2 восстанавливал содержание PSD-95 с терапевтическим эффектом 70% при начале его введения через 6 ч после операции, вызывая, однако, при начале введения через 24 ч лишь тенденцию ( $p = 0.08$ ) к восстановлению уровня этого маркера (рис. 4).

При этом на содержание синаптофизина в стриатуме ГК-2 не оказывал статистически значимого влияния (рис. 5).

Возможным объяснением отсутствия изменений пресинаптического белка синаптофизина при введении ГК-2 является формирование пресинаптических терминалей на конечных этапах нейрогенеза, для за-

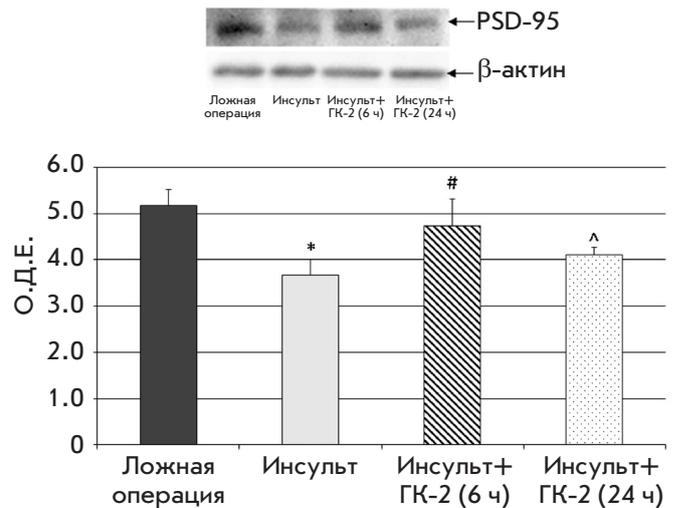
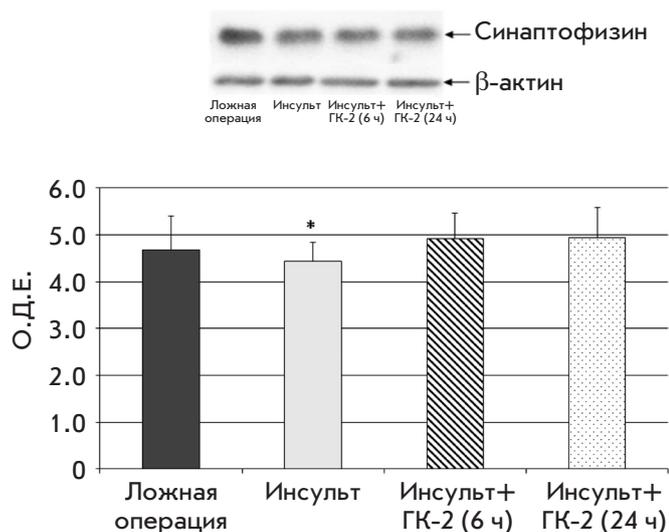


Рис. 4. Влияние ГК-2 на содержание белка постсинаптической плотности PSD-95 в стриатуме при субхроническом (7 дней) введении (1 мг/кг, в/б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс. ГК-2 начинали вводить через 6 и 24 ч после операции. О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «ложная операция», # –  $p < 0.1$  по сравнению с группой «инсульт»; ^ –  $p < 0.1$  по сравнению с группой «инсульт» (U-тест Манна-Уитни)



**Рис. 5.** Влияние ГК-2 на содержание пресинаптического маркера синаптофизина в стриатуме при субхроническом (7 дней) введении (1 мг/кг, в/б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средне мозговой артерии у крыс. ГК-2 начинали вводить через 6 и 24 ч после операции. О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «ложная операция» (U-тест Манна–Уитни)

вершения которого требуется не менее 3 недель. С другой стороны, белок постсинаптической плотности PSD-95 входит в состав дендритных шипиков, которые формируются в более короткие сроки [24]. На основании полученных данных можно заключить, что через 7 дней после экспериментального инсульта ГК-2 стимулировал стриатальный синаптогенез на уровне образования дендритных шипиков.

Для оценки вклада нейрогенерации в защитные эффекты ГК-2 в условиях экспериментального инсульта мы сопоставили полученные нами биохимические

данные с результатами ранее выполненного морфологического изучения [17] влияния ГК-2 на снижение объема ишемического повреждения мозга. Все эффекты дипептида оценивали на 7-е сут после операции (см. таблицу).

Как видно из таблицы, ГК-2 снижал объем ишемического повреждения на 60 и 24% при начале введения через 6 и 24 ч после операции соответственно. Через 6 ч после инсульта согласно [18] сохраняется значительное количество нейронов пенумбры, которые могут выжить в результате нейропротекторного действия ГК-2. Вероятно, что восстановление мозга частично происходит и за счет нейрогенеза. Через 24 ч в отсутствие пенумбры восстановление поврежденной ткани мозга (на 24%) возможно только за счет регенеративных процессов. Полученные данные позволяют предположить, что регенерация за счет пролиферации и миграции новых клеток не зависит от объема пенумбры, на что указывают сходные показатели иммунореактивности Ki67 при начале введения ГК-2 через 6 и 24 ч после операции.

В то же время синаптогенез, судя по результатам определения постсинаптического маркера PSD-95, может зависеть от общего количества живых нейронов как выживших, так и вновь сформированных. Изменение плотности этого маркера в присутствии ГК-2 пропорционально восстановлению объема нейронов в зоне ишемического повреждения (72/60 и 30/24 соответственно).

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты позволяют заключить, что эффект ГК-2 при начале терапевтического введения в короткие интервалы времени после моделирования инсульта связан как с нейропротективными, так и с репаративными процессами, в то время как при начале введения через 24 ч эффект реализуется за счет стимуляции репаративных процессов, включающих как нейрогенез (и возможно глиогенез), так и синаптогенез.

**Нейропротекторные и нейрогенеративные эффекты ГК-2 (1 мг/кг, 7 дней) на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средне мозговой артерии у крыс**

Начало введения после операции, ч	Снижение объема ишемического повреждения [17], %	Стимуляция нейрогенеза (по маркеру пролиферации Ki67), терапевтический эффект, %		Стимуляция синаптогенеза в стриатуме (по постсинаптическому маркеру PSD-95), терапевтический эффект, %
		гиппокамп	стриатум	
6	60*	220*	37^	72*
24	24*	205*	36^	30^

Примечание. Терапевтический эффект рассчитывали по формуле: [(содержание белка в группе «инсульт+ГК-2» – содержание белка в группе «инсульт»)/(содержание белка в группе «ложная операция» – содержание белка в группе «инсульт»)] × 100%. \* –  $p < 0.05$ ; ^ –  $p < 0.1$  по сравнению с группой «инсульт» (U-тест Манна–Уитни).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Димерный дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов ГК-2 при его субхроническом введении в условиях экспериментального ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией среднемозговой артерии, и первом введении через 6 и 24 ч после операции статистически значимо восстанавливает сниженную пролиферацию нейрональных стволовых клеток в гиппокампе и вызывает тенденцию к увеличению пролиферативной активности в стриатуме по маркеру Ki67. Исходя из ранее полученных данных об улучшении неврологического статуса крыс при введении ГК-2 в условиях, аналогичных условиям настоящего эксперимента [17], мы можем предположить, что стимуляция про-

лиферативной активности под действием дипептида приводит, по крайней мере преимущественно, к нейрогенезу. Действие ГК-2 приводит к повышению количества синаптических контактов, сниженному после операции, которое оценивали по постсинаптическому маркеру PSD-95, при первом введении через 6 ч после операции и вызывает тенденцию к увеличению этого параметра при первом введении через 24 ч. Полученные данные позволяют сделать вывод о стимулирующем влиянии ГК-2 на нейрогенез (и, возможно, глиогенез) и синаптогенез в условиях экспериментальной церебральной ишемии. ●

*Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 18-15-00381) и РФФИ (проект № 18-015-00228).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jiang H., Tian S., Zeng Y., Shi J. // J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci. 2008. V. 28. № 4. P. 379–382.
- Hassanzadeh P., Arbabi E., Atyabi F., Dinarvand R. // Life Sci. 2017. V. 179. P. 15–22.
- Park J.H., Kang S.S., Kim J.Y., Tchah H. // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. V. 57. № 15. P. 6767–6775.
- Yang J.P., Liu H.J., Yang H., Feng P.Y. // Neurol. Sci. 2011. V. 32. № 3. P. 433–441.
- Frielingsdorf H., Simpson D.R., Thal L.J., Pizzo D.P. // Neurobiol. Dis. 2007. V. 26. № 1. P. 47–55.
- Zhu W., Cheng S., Xu G., Ma M., Zhou Z., Liu D., Liu X. // Drug Deliv. 2011. V. 18. № 5. P. 338–343.
- Tirassa P., Maccarone M., Carito V., De Nicolò S., Fiore M. // Eur. J. Neurosci. 2015. V. 41. № 9. P. 1207–1218.
- Tirasa P. // Arch. Ital. Biol. 2011. V. 149. № 2. P. 205–213.
- Zhang H., Petit G.H., Gaughwin P.M., Hansen C., Ranganathan S., Zuo X., Smith R., Roybon L., Brundin P., Mobley W.C., et al. // J. Huntingtons. Dis. 2013. V. 2. № 1. P. 69–82.
- Cao J.-Y., Lin Y., Han Y.-F., Ding S.-H., Fan Y.-L., Pan Y.-H., Zhao B., Guo Q.-H., Sun W.-H., Wan J.-Q., et al. // CNS Neurosci. Ther. 2018. V. 24. № 6. P. 508–518.
- Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L. // J. Transl. Med. 2012. V. 10. № 1. P. 239.
- Price R.D., Milne S.A., Sharkey J., Matsuoka N. // Pharmacol. Ther. 2007. V. 115. № 2. P. 292–306.
- Gudasheva T.A., Antipova T.A., Seredenin S.B. // Dokl. Biochem. Biophys. 2010. V. 434. P. 262–265.
- Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Firsova Y.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B. // J. Biomed. Sci. 2015. V. 22. P. 106.
- Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середин С.Б. // Бюл. эксп. биологии и медицины. 2010. Т. 150. № 11. С. 537–540.
- Середин С.Б., Гудашева Т.А. // Журн. неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2015. № 6. С. 63–70.
- Середин С.Б., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А. // Журн. неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2018. № 7. С. 49–53.
- McCullough L.D., Liu F. // J. Biomed. Biotechnol. 2011. V. 2011. P. 464701–464701.
- Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. // Stroke. 1989. V. 20. № 1. P. 84–91.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 9. P. 4350–4354.
- Lowery O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
- Lindvall O., Kokaia Z. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015. V. 7. № 11. P. a019034.
- Christie K.J., Turnley A.M. // Front. Cell. Neurosci. 2013. V. 6. P. 70.
- Lippman J., Dunaevsky A. // J. Neurobiol. 2005. V. 64. № 1. P. 47–57.