

© Коллектив авторов, 2020

Преко́ндиционирование уабаином снижает вызванный компрессионной ишемией головного мозга неврологический дефицит у крыс

Е.В. Стельмашук¹, Е.Е. Генрихс¹, Н.К. Исаев^{1,2}, С.В. Новикова¹, Л.Г. Хаспеков¹

¹ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Ишемическое повреждение головного мозга является важнейшей нейробиологической и медико-социальной проблемой, поэтому экспериментальное исследование патогенеза церебральной ишемии и поиск возможных способов минимизации ее последствий особенно актуальны.

Цель работы — выявить возможность снижения неврологического дефицита и функциональной асимметрии работы конечностей экспериментальных крыс посредством ишемической толерантности, вызванной действием блокатора Na^+/K^+ -АТФазы уабаина.

Материалы и методы. Церебральную ишемию моделировали с помощью 20-минутной фокальной компрессии сенсомоторной коры левого полушария головного мозга крысы. Для индуцирования толерантности экспериментальным животным однократно внутривенно вводили ингибитор Na^+/K^+ -АТФазы уабаин за 24 или 72 ч до ишемического воздействия. Для оценки функциональных нарушений использовали тесты определения неврологического дефицита конечностей и оценки работоспособности передних конечностей экспериментальных животных.

Результаты. Предварительное введение блокатора Na^+/K^+ -АТФазы уабаина (0,7 мг/кг) препятствовало развитию функциональных нарушений, вызванных компрессионной ишемией ткани сенсомоторной коры головного мозга: асимметрия работы конечностей уменьшалась, степень нарушений их двигательных функций снижалась.

Заключение. Фармакологическое преко́ндиционирование уабаином повышает устойчивость мозга животных к последующей компрессионной ишемии, препятствуя возникновению асимметрии работы и улучшая функционирование как правых, так и левых конечностей. Полученные данные расширяют перспективу терапевтического использования блокаторов Na^+/K^+ -АТФазы при церебральной ишемии.

Ключевые слова: компрессионная ишемия; ишемическая толерантность; функциональный дефицит.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Адрес для корреспонденции: 105064, Москва, пер. Обуха, д. 5, стр. 2. ФГБНУ НЦН. E-mail: estelmash@mail.ru. Стельмашук Е.В.

Для цитирования: Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Исаев Н.К., Новикова С.В., Хаспеков Л.Г. Преко́ндиционирование уабаином снижает вызванный компрессионной ишемией головного мозга неврологический дефицит у крыс. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2020; 14(4): 54–60.

DOI: 10.25692/ACEN.2020.4.7

Поступила 10.04.2020 / Принята в печать 08.10.2020

Preconditioning with ouabain reduces the neurological deficit in rats caused by compression-induced cerebral ischemia

Elena V. Stelmashook¹, Elizaveta E. Genrikhs¹, Nikolay K. Isaev^{1,2}, Svetlana V. Novikova¹, Leonid G. Khaspekov¹

¹Research Center of Neurology, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Ischaemic brain damage is a major neurobiological and medical social problem, making experimental research of the pathogenesis of cerebral ischemia and the search for ways to minimize its consequences particularly relevant.

The aim of the study was to determine the possibility of reducing the neurological deficit and functional limb asymmetry in laboratory rats through ischaemic tolerance using ouabain, a Na^+/K^+ -ATPase inhibitor.

Materials and methods. Cerebral ischemia was modeled using 20-minute focal compression of the left sensorimotor cortex in the rat brain. To induce tolerance, laboratory animals were given a single intravenous injection of 0.7 mg/kg of the Na^+/K^+ -ATPase inhibitor ouabain 24 or 72 hours before the ischaemic event.

Functional impairment was assessed with tests for neurological deficits in the limbs and a test for forelimb performance in laboratory animals.

Results. Preliminary ouabain administration prevented the development of functional impairment due to compression-induced ischemia of the sensorimotor cortex, with a decrease in limb asymmetry and the severity of motor dysfunction.

Conclusion. In animals, pharmacological preconditioning with ouabain increases the brain's resistance to subsequent compression-induced ischemia, preventing functional asymmetry and improving both right and left limb function. The obtained data expand the possibilities of using Na^+/K^+ -ATPase inhibitors to treat cerebral ischemia.

Keywords: compression-induced ischemia; ischaemic tolerance; functional deficit.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 105064, Russia, Moscow, per. Obukha 5, build. 2. Research Center of Neurology. E-mail: estelmash@mail.ru. Stelmashook E.V.

For citation: Stelmashook E.V., Genrikhs E.E., Isaev N.K., Novikova S.V., Khaspekov L.G. [Preconditioning with ouabain reduces the neurological deficit in rats caused by compression-induced cerebral ischemia]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2020; 14(4): 54–60. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2020.4.7

Received 10.04.2020 / Accepted 08.10.2020

Введение

Ишемическое повреждение головного мозга является важнейшей нейробиологической и медико-социальной проблемой вследствие его значительной распространенности и тяжести медицинских, социальных и экономических последствий. Острые нарушения мозгового кровообращения (инсульты) — вторая, после ишемической болезни сердца, наиболее частая причина смертности населения в мире [1]. В России регистрируются 350–400 случаев инсульта в год на 100 тыс. населения. По данным Научного центра неврологии, двигательные нарушения после инсульта к концу его острого периода наблюдаются у 85% выживших пациентов, а к концу первого года — у 70%, тогда как речевые нарушения (афазия) — у 36 и 18% соответственно [2]. Поэтому экспериментальное изучение патогенеза ишемического повреждения головного мозга и поиск способов минимизации его последствий чрезвычайно актуальны. Одним из таких способов является индукция ишемической толерантности, исследование механизмов которой представляет значительный интерес как для теоретической нейробиологии, так и для практической медицины.

Цель работы — выявить возможность снижения неврологического дефицита и функциональной асимметрии работы конечностей экспериментальных крыс посредством ишемической толерантности, вызванной действием блокатора Na^+/K^+ -АТФазы уабаина.

Материалы и методы

Исследование выполнено на крысах-самцах Вистар массой 180–250 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме и свободном доступе к воде и корму. Компрессионная ишемия выполнялась по описанному ранее [3] и модифицированному нами методу. Для моделирования компрессионной ишемии левого полушария головного мозга в трепанационное отверстие, высверленное в черепе наркотизированных хлоралгидратом (3%, 330 мг/кг внутривенно) животных над зоной сенсорной коры, помещали подвижный тефлоновый поршень диаметром 4 мм с грузом 50 г, который в течение 20 мин оказывал давление на ткань мозга. При ложной операции проводили те же манипуляции: анестезия, закрепление в стереотаксисе, разрез и зашивание кожи,

за исключением трепанации черепа и компрессии ткани мозга. Уабаин, растворенный в физиологическом растворе (ФР), вводили в боковую хвостовую вену (по 0,1 мл, 0,7 мг/кг) за 24 или 72 ч до операции. Крысам группы сравнения вводили ФР в том же объеме.

Для оценки функциональных нарушений, вызванных ишемией, использовали тест определения неврологического дефицита конечностей экспериментальных животных [4], который проводили до введения препарата, непосредственно перед операцией, а затем на 1-е и 7-е сутки после моделирования ишемии [5]. Максимальная сумма баллов в нем составляла для каждой конечности 12 и определяла ответ задних и передних конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию [4]. Также применяли способ оценки работоспособности передних конечностей у экспериментальных животных [6]. Крысе, плавно поднятой за хвост, позволяли ухватиться за перекладину и далее ее непрерывно пытались оттянуть от перекладины до тех пор, пока животное не утрачивало хватку. Каждую конечность оценивали отдельно: удержание перекладины более 10 с — 2 балла; 5–10 с — 1,5 балла; 2–4 с — 1 балл; захват без удержания перекладины — 0,5 балла; отсутствие захвата — 0 баллов. Используемые тесты позволили оценить асимметрию функционирования левых и правых конечностей [7]. Все тесты проводились экспериментатором вслепую. Частоту сердечных сокращений (ЧСС) определяли в те же сроки с помощью прибора CODA Monitor («Kent Scientific»).

Для морфологического контроля наличия очага повреждения в ишемизированной области мозг животных фиксировали методом погружения в смесь формалин : спирт : уксусная кислота в пропорции 2 : 7 : 1 в течение суток, нарезали на вибраторе («Cam-7000smz-2») с шагом 100 мкм, окрашивали 0,2% раствором метиленового синего, обезвоживали и заключали в Энтеллан («Merck»). Гистологические препараты (рис. 1, А) сканировали на слайд-приставке сканера «Epson perfection V100 PHOTO». Площадь повреждения (в мм²) измеряли с помощью программы анализа компьютерных изображений «ImageJ». Объем повреждения высчитывали по формуле цилиндра [8]. Депарафинированные микротомные срезы толщиной 10 мкм окрашивали кризильным фиолетовым, проводили по спиртам восходящей концентрации и заключали в бальзам (рис. 1, В). Фотографии получали на микроскопе «Olympus CKX41».

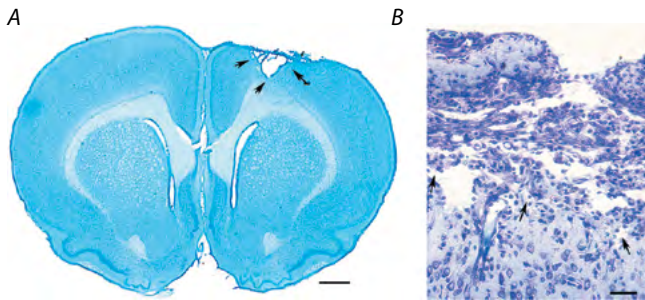


Рис. 1. Морфологический контроль очага повреждения головного мозга крысы через 7 сут после моделирования компрессионной ишемии.
A — вибротомный срез мозга крысы; окраска метиленовым синим. B — гистологический препарат области повреждения; окраска крезилловым фиолетовым. Стрелками указан ишемический очаг. Масштабный отрезок: 1 мм (A), 50 мкм (B).

Fig. 1. Morphological monitoring of the rat brain lesion, 7 days after compression-induced ischemia modeling.
A — vibratome section of the rat brain, stained with methylene blue; B — histological preparation of the damaged area, stained with cresyl violet. Arrows indicate the ischaemic lesion. Scale bar: 1 mm (A), 50 microns (B).

В экспериментах по моделированию компрессионной ишемии на каждую точку было прооперировано не менее 8 животных. Для статистического анализа использовали тест ANOVA с посттестом Bonferroni. Отличия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее с ошибкой среднего ($M \pm SEM$).

Все процедуры выполняли в соответствии с директивами Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН.

Результаты

Несмотря на то что убаин является сердечным гликозидом, в используемой нами концентрации он не оказывал достоверного влияния на ЧСС животных. Показатели ЧСС у интактных крыс варьировали от 324 до 478 уд/мин и в среднем составляли 410 ± 13 уд/мин. Введение животным как ФР, так и убаина через 1 сут приводило к незначительному (на 7–10%) снижению ЧСС. К концу эксперимента ЧСС в обеих группах значимо не отличалась от исходных значений.

До ишемии все животные в тесте определения неврологического дефицита конечностей набирали максимальное количество баллов, равное 12 для левых и правых конечностей (рис. 2). Введение убаина не оказывало влияния на работоспособность передних и задних конечностей (рис. 2). Через 24 ч после индукции левосторонней компрессионной ишемии у животных возникала ярко выраженная асимметрия в работоспособности контра- и ипсилатеральных очагу повреждения конечностей. В 1-й день после операции работоспособность правых (контралатеральных) конечностей была достоверно ниже исходной ($p < 0,01$) и составляла $5,8 \pm 0,4$ балла ($n = 10$). Достоверность различий сохранялась в течение всего эксперимента (7 дней). Для левых (ипсилатеральных) конечностей этот показатель был значительно выше ($10,7 \pm 0,1$ балла, $n = 10$), но также достоверно отличался от контрольного значения ($p < 0,01$). Как видно на рис. 2, A, снижение работоспособ-

ности правых конечностей было значительно меньше, если животным вводили убаин за 24 ч до индукции ишемии. В этом случае в 1-й день после ишемии животные набирали для правых конечностей $6,9 \pm 0,4$ балла ($n = 9$), что достоверно отличалось от животных, не получавших убаин ($p < 0,05$). Для левых конечностей этот показатель в присутствии убаина составлял $11,3 \pm 0,2$ балла ($n = 10$) (рис. 2, C). Однако на 7-е сутки после ишемии защитное действие убаина уже не обнаруживалось.

При введении убаина за 72 ч до ишемии защитный эффект был более выраженным и устойчивым, сохраняясь до 7-х суток после ишемии. Так, в 1-е сутки после ишемии правые конечности животных этой группы набирали $7,2 \pm 0,3$ балла ($n = 8$), и этот показатель значимо не изменялся к 7-м суткам (рис. 2, B). Работа левых конечностей животных, получавших убаин, достоверно не отличалась от исходных показателей до ишемии (рис. 2, C, D).

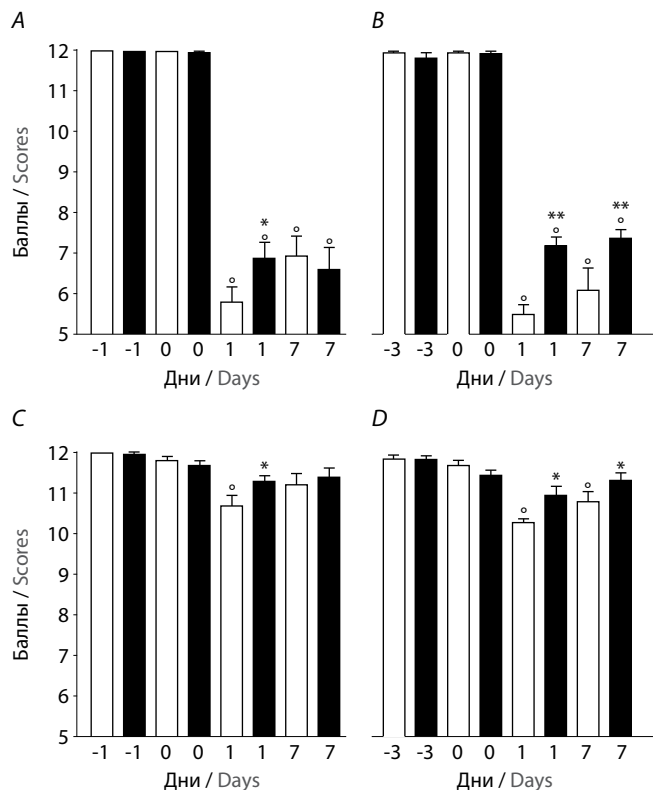


Рис. 2. Внутривенное введение убаина за 24 (–1: A, C) или 72 (–3: B, D) ч до ишемии препятствует нарушению функций конечностей при моделировании ишемического повреждения в зоне сенсомоторной коры левого полушария у крыс.

Тест определения неврологического дефицита конечностей экспериментальных животных. A, B — правые конечности; C, D — левые конечности. Белые столбики — животные, которым вводили ФР; черные столбики — животные, предварительно получившие убаин. 0 — день операции. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с животными, получившими ФР; * $p < 0,01$ по сравнению с животными до операции (белый столбик на "0" день).

Fig. 2. Intravenous administration of ouabain 24 hours (–1: A, C) or 72 hours (–3: B, D) before ischemia prevents limb dysfunction when modeling ischaemic damage in the left sensorimotor cortex in rats.

Test for determining the neurological deficit in the limbs of laboratory animals. A, B — right limbs; C, D — left limbs. White columns — animal group injected with saline; black columns — animal group pretreated with ouabain. 0 — day of the operation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the animals treated with saline; * $p < 0.01$ compared to the animals before surgery.

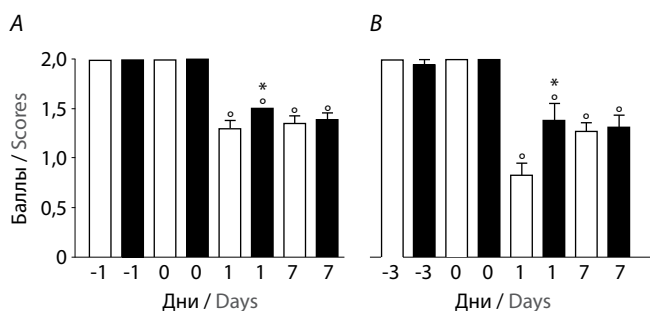


Рис. 3. Внутривенное введение уабаина за 24 (А) или 72 ч (В) до операции уменьшает нарушение функционирования правых передних конечностей при моделировании ишемического повреждения зоны сенсомоторной коры левого полушария у крыс.

Тест оценки работоспособности передних конечностей у экспериментальных животных. 0 — день операции. Белые столбики — животные, которым вводили ФР; черные столбики — животные, предварительно получившие уабаин. * $p < 0,01$ по сравнению с животными до операции; * $p < 0,01$ по сравнению с животными, которым вводили ФР.

Fig. 3. Intravenous administration of ouabain 24 hours (A) or 72 hours (B) before surgery reduces right forelimb dysfunction when modeling ischaemic damage to the left sensorimotor cortex in rats.

Test for evaluating forelimb performance in laboratory animals. 0 — day of the operation. White columns — animal group injected with saline; black columns — animal group pretreated with ouabain. * $p < 0.01$ compared to animals injected with saline.

У ложнооперированных животных неврологического дефицита не наблюдалось, они продолжали набирать максимальное количество баллов на протяжении всего эксперимента (данные не показаны).

Контрольное морфологическое исследование головного мозга животных на 7-е сутки после ишемии показало наличие очага повреждения в области сенсомоторной коры у всех оперированных крыс (рис. 1). Четко очерченная зона некроза (на рис. 1 указана стрелками) содержит пикнотические ядра погибших клеток. За очаг повреждения принимали недостающий фрагмент ткани мозга, распавшийся в результате некроза. Объем такого очага в среднем составлял $14 \pm 1 \text{ мм}^3$, и его отличие у крыс, инъецированных уабаином, от объема очага после инъекции животным ФР было недостоверным. Следует отметить, что объем ишемического очага у крыс, получавших уабаин, варьировал в более широких пределах (2–40 мм^3), тогда как у животных, которым вводили ФР, — 12–16 мм^3 .

Выраженный эффект толерантности к ишемии после предобработки уабаином был подтвержден в тесте оценки неврологического дефицита передних конечностей. До ишемии все животные в этом тесте набирали максимальное количество баллов, равное 2 (рис. 3). Через 24 ч после индукции левосторонней ишемии у животных возникла ярко выраженная асимметрия в работоспособности передних конечностей. Работоспособность передних конечностей, расположенных контралатерально очагу повреждения, была значительно ниже исходной ($p < 0,01$, рис. 3, А) и составляла $1,3 \pm 0,1$ ($n = 10$), а для ипсилатеральных конечностей достоверно не отличалась от исходной ($1,8 \pm 0,1$; $n = 10$).

Как видно на рис. 3, А, снижение работоспособности правых передних конечностей было достоверно меньше, если животным вводили уабаин за 24 ч до индукции ишемии. В этом случае в 1-й день после операции показатели для правой передней конечности составляли 1,5 балла ($n = 9$),

что достоверно отличалось от соответствующих показателей у животных, получавших ФР ($p < 0,05$). Однако на 7-е сутки после ишемии защитный эффект уабаина утрачивался.

Введение уабаина за 72 ч до ишемии (рис. 3, В) также оказывало достоверное защитное действие: средний балл в тесте определения работоспособности контралатеральных конечностей через день после ишемии был $0,8 \pm 0,1$ ($n = 9$) в отсутствие уабаина и $1,4 \pm 0,2$ ($n = 8$) в его присутствии.

Таким образом, результаты экспериментов демонстрируют, что количество баллов, набираемое животными в двух различных тестах после индукции ишемии, достоверно ниже, чем до операции, однако предварительное введение уабаина достоверно снижает неврологический дефицит по сравнению с животными, которым вводили только ФР.

Обсуждение

Явление индукции ишемической толерантности нейронов было обнаружено в 1990 г. [9]. Показано, что нейроны головного мозга монгольских песчанок, подвергнутых кратковременной сублетальной глобальной ишемии, становятся более устойчивыми к последующему летальному ишемическому воздействию. Обнаружено также, что ишемическую толерантность можно вызвать предварительным введением тринитропропионовой кислоты — блокатора комплекса II дыхательной цепи митохондрий [10] — или умеренным окислительным стрессом, индуцируемым гипероксигенацией [11], имитируя таким образом отдельные звенья ишемического нейродеструктивного процесса.

Известно, что к характерным изменениям функциональных свойств нейронов при ишемии относятся как уменьшение количества участков связывания блокатора Na^+/K^+ -АТФазы уабаина на клеточной мембране [12], так и снижение активности самого фермента [13]. Более того, транзиторное снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в культурах нейронов коры головного мозга повышало их толерантность к последующей кислородно-глюкозной депривации [14, 15], а также препятствовало эксайтотоксичности глутамата и его аналогов и снижало индуцированную глутаматом кальциевую перегрузку культивируемых нейронов мозжечка [16–18]. Позднее была продемонстрирована возможность индукции толерантности зернистых нейронов мозжечка *in vitro* к окислительному стрессу путем транзиторной модуляции активности Na^+/K^+ -АТФазы уабаином [19]. Нейропротекторные свойства уабаина были показаны и на других моделях нейродегенерации. Так, 100 мкМ уабаина препятствовали развитию апоптоза [20] или окислительного стресса [19] *in vitro*. Показано, что 1 мкМ уабаина вызывает уменьшение активности Na^+/K^+ -АТФазы в микросомальной фракции больших полушарий мозга крысы и может запускать различные сигнальные каскады в нейронах [21].

В ряде работ показано, что наномолярные концентрации кардиотонических стероидов при одновременном или краткосрочном (за минуты) предварительном введении оказывают защитное действие путем активации Na^+/K^+ -АТФазы, способствуя нейропротекции. При этом уабаин препятствовал деструкции нейронов в гиппокампе крыс под влиянием окислительного стресса, ассоциированного с нейровоспалением, индуцированным липополисахаридом [22]. Нейропротекторная активность дигоксина и его полусинтетических производных, препятствующая по-

вреждающему действию окислительного стресса, индуцируемого химической ишемией, обнаружена в культуре клеток мышинной нейроблостомы N2a [23]. В культуре клеток коры головного мозга крысы уабаин препятствовал апоптозу, вызываемому цитотоксическим действием на нейроны агонистов глутаматных рецепторов [24]. В этих экспериментах можно говорить о прямом нейропротекторном действии наномолярных концентраций кардиотонических стероидов. В то же время превышение сублетальной концентрации уабаина приводило к гибели культивированных нейронов [25, 26]. Исходя из приведенных выше данных, мы предположили, что защитить нейроны от ишемического повреждения можно фармакологическим прекодиционированием, индуцируемым *in vivo* предварительным введением (за несколько суток до ишемии) уабаина в концентрации 1 мкмоль на 1 кг веса животного. Полученные нами результаты подтвердили это предположение и показали, что такое прекодиционирование повышает устойчивость мозга крыс к последующей односторонней компрессионной ишемии, достоверно снижая вызванную ишемией асимметрию работы конечностей и неврологический дефицит, а также улучшая функционирование как правых, так и левых конечностей.

Эти данные подтверждают результаты работы других авторов, полученные в опытах на новорожденных крысах с использованием комбинированной модели ишемии/гипоксии головного мозга [27] и показавшие, что прекодиционирование другим ингибитором Na^+/K^+ -АТФазы — дигоксином способствует восстановлению утраченных функций и оказывает выраженный нейропротекторный эффект. Видимо, транзиторный дисбаланс системы активного транспорта ионов калия в клетки головного мозга участвует не только в ишемии-реперфузии головного мозга, но и в индукции ишемической толерантности. Интересно, что ишемическое прекодиционирование (2-минутная

ишемия) предотвращало ингибирующее действие индуцированной через 24 ч 10-минутной ишемии/реперфузии на активность Na^+/K^+ -АТФазы, которое наблюдалось в отсутствие прекодиционирования [28]. Авторы предположили, что поддержание активности Na^+/K^+ -АТФазы, обеспечиваемое прекодиционированием, связано с клеточной нейропротекцией, что полностью согласуется с нашими результатами.

Несмотря на значительный нейропротекторный эффект уабаина, вызывавшего выраженное снижение неврологического дефицита, нам не удалось выявить зависимость этого эффекта от размера ишемического очага. По-видимому, в нашей модели компрессионной ишемии нейропротекторное действие уабаина в первую очередь направлено на пластические перестройки и восстановление или предотвращение диффузных повреждений, развивающихся вследствие повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера, окислительного стресса, глутаматной токсичности и воспалительных процессов в головном мозге. Кроме того, обнаруженная нами четко очерченная зона некроза была отмечена в одной из опубликованных ранее работ [29], показавшей хорошо заметное разграничение между нормальной и ишемизированной тканями, без переходной зоны, лишенной некроза, которая обычно наблюдается в других моделях инфаркта мозга.

Заключение

Мы показали, что фармакологическое прекодиционирование уабаином повышает устойчивость мозга животных к последующей компрессионной ишемии, снижая вызванную ишемией асимметрию работы конечностей и неврологический дефицит экспериментальных крыс, улучшая функционирование как контралатеральных, так и ипсилатеральных передних и задних конечностей.

Список литературы

1. Donnan G.A., Fisher M., Macleod M., Davis S.M. Stroke. *Lancet* 2008; 371: 1612–1623. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60694-7. PMID: 18468545.
2. Корчагин В.И., Миронов К.О., Дрибноходова О.П. и др. Роль генетических факторов в формировании индивидуальной предрасположенности к ишемическому инсульту. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2016; 10(1): 65–75.
3. Бакеева Л.Е., Барсков И.В., Егоров М.В. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 2. Терапия некоторых старческих патологий, опосредованных АФК (сердечной аритмии, инфарктов сердца и почки и инсульта головного мозга). *Биохимия* 2008; 73(12): 1607–1621. DOI: 10.1134/S000629790812002x. PMID: 19120015.
4. Генрикс Е.Е., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К. Способ оценки неврологического дефицита конечностей у экспериментальных крыс. Патент РФ № 2697791 на изобретение. 2019.
5. Genrikhs E.E., Stelmashook E.V., Kapkaeva M.R. et al. Modeling of focal injury in the left hemisphere of rat brain and functional assessment depending on the severity of damage in the posttraumatic period. *Journal of asymmetry*. 2016; 10(4): 26–33.
6. Генрикс Е.Е., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К. Способ оценки работоспособности передних конечностей у экспериментальных животных. Патент РФ № 2714479 на изобретение. 2020.
7. Генрикс Е.Е., Стельмашук Е.В., Капкаева М.Р. и др. Изменение функциональной асимметрии конечностей при моделировании односторонней черепно-мозговой травмы различной степени тяжести. *Асимметрия* 2018; 12(2): 5–17. DOI: 10.18454/asy.2018.2.14181.
8. Генрикс Е.Е., Капкаева М.Р., Новикова С.В. и др. Зависимость объема повреждения ткани головного мозга от тяжести черепно-мозговой травмы. *Асимметрия* 2018; 12(4): 154–159. DOI: 10.18454/ASY.2018.12.4.007.
9. Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M. et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990; 528: 21–24. DOI: 10.1016/0006-8993(90)90189-i. PMID: 2245337.

References

1. Donnan G.A., Fisher M., Macleod M., Davis S.M. Stroke. *Lancet* 2008; 371: 1612–1623. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60694-7. PMID: 18468545.
2. Korchagin V.I., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P. et al. [A role of genetic factors in the development of individual predisposition to ischemic stroke]. *Annals of Clinical and Experimental Neurology* 2016; 10(1): 65–75. (In Russ.)
3. Bakeeva L.E., Barskov I.V., Egorov M.V. et al. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 2. Treatment of some ROS- and age-related diseases (heart arrhythmia, heart infarctions, kidney ischemia, and stroke). *Biochemistry (Mosc)* 2008; 73(12): 1288–1299. DOI: 10.1134/S000629790812002x. PMID: 19120015. (In Russ.)
4. Genrikhs E.E., Stelmashook E.V., Isaev N.K. Method for assessing neurological limb deficiency in experimental rats. Patent RF No. 2697791 for invention. 2019. (In Russ.)
5. Genrikhs E.E., Stelmashook E.V., Kapkaeva M.R. et al. Modeling of focal injury in the left hemisphere of rat brain and functional assessment depending on the severity of damage in the posttraumatic period. *Journal of asymmetry* 2016; 10(4): 26–33.
6. Genrikhs E.E., Stelmashook E.V., Isaev N.K. Method for evaluating the performance of the forelimbs in experimental animals. Patent RF No. 2714479 for invention. 2020. (In Russ.)
7. Genrikhs E.E., Stelmashook E.V., Kapkaeva M.R. et al. [The change of functional limb asymmetry in modelling the unilateral traumatic brain injury of varying severity]. *Asimetriya* 2018; 12(2): 5–17. DOI: 10.18454/asy.2018.2.14181. (In Russ.)
8. Genrikhs E.E., Kapkaeva M.R., Novikova S.V. et al. [Dependence of volume of brain tissue damage from the severity of traumatic brain injury] *Asimetriya* 2018; 12(4): 154–159. DOI: 10.18454/ASY.2018.12.4.007. (In Russ.)
9. Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M. et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990; 528: 21–24. DOI: 10.1016/0006-8993(90)90189-i. PMID: 2245337.
10. Weih M., Bergk A., Isaev N.K. et al. Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons by 3-nitropropionic acid: chemical preconditioning. *Neu-*

10. Weih M., Bergk A., Isaev N.K. et al. Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons by 3-nitropropionic acid: chemical preconditioning. *Neurosci Lett* 1999; 272: 207–210. DOI: 10.1016/S0304-3940(99)00594-7. PMID: 10505617.
11. Zhai X., Lin H., Chen Y. et al. Hyperbaric oxygen preconditioning ameliorates hypoxia-ischemia brain damage by activating Nrf2 expression in vivo and in vitro. *Free Radic Res* 2016; 50: 454–466. DOI: 10.3109/10715762.2015.1136411. PMID: 26729624.
12. Pylova S.I., Majkowska J., Hilgier W. et al. Rapid decrease of high affinity ouabain binding sites in hippocampal CA1 region following short-term global cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1989; 490: 170–173. DOI: 10.1016/0006-8993(89)90446-0. PMID: 2547499.
13. Nagafuji T., Koide T., Takato M. Neurochemical correlates of selective neuronal loss following cerebral ischemia: role of decreased Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Brain Res* 1992; 571: 265–271. DOI: 10.1016/0006-8993(92)90664-u. PMID: 1535268.
14. Bruer U., Weih M.K., Isaev N.K. et al. Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 1997; 414: 117–121. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00954-x. PMID: 9305743.
15. Лопачев А.В., Лопачева О.М., Куличенкова К.Н. и др. Действие убаина и буфалина на нейроны первичной культуры коры больших полушарий мозга крысы в условиях глюкозо-кислородной депривации. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2019; 22(10): 19–24. DOI: 10.29296/25877313-2019-10-03.
16. Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Андреева Н.А., Викторов И.В. Убаин модулирует токсическое действие глутамата в диссоциированных культурах клеток-зерен мозжечка крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1996; 122(8): 163–166. PMID: 9081467.
17. Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Генрикс Е.Е. и др. Транзиторное ингибирование Na⁺/K⁺-АТФазы снижает индуцированную глутаматом кальциевую перегрузку культивируемых зернистых нейронов мозжечка. *Асимметрия* 2018; 12(4): 476–481. DOI: 10.18454/ASY.2018.12.4.016.
18. Лопачев А.В., Лопачева О.М., Куликова О.И., Федорова Т.Н. Убаин уменьшает эксайтотоксический эффект каината и количество каинатных KA2 рецепторов в первичной культуре нейронов больших полушарий мозга крысы. *Асимметрия* 2019; 13(4): 14–21. DOI: 10.25692/ASY.2019.13.4.002.
19. Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Генрикс Е.Е., Хаспеков Л.Г. Влияние модуляции активности Na⁺/K⁺-АТФазы на жизнеспособность зернистых нейронов мозжечка при индукции окислительного стресса in vitro. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2018; 12(4): 52–56. DOI: 10.25692/ACEN.2018.4.7.
20. Isaev N.K., Stelmashook E.V., Halle A. et al. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity in cultured rats cerebellar granule cells prevents the onset apoptosis induced by low potassium. *Neurosci Lett* 2000; 283: 41–44. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)00903-4. PMID: 10729629.
21. Лопачев А.В., Лопачева О.М., Никифорова К.А. и др. Сравнительное действие кардиотонических стероидов на внутриклеточные процессы в нейронах коры головного мозга крысы. *Биохимия* 2018; 83(2): 238–250. DOI: 10.1134/S0006297918020062. PMID: 29618300.
22. Garcia I.J.P., Kinoshita P.F., Silva L.N.D.E et al. Ouabain attenuates oxidative stress and modulates lipid composition in hippocampus of rats in lipopolysaccharide-induced hippocampal neuroinflammation in rats. *J Cell Biochem* 2019; 120: 4081–4091. DOI: 10.1002/jcb.27693. PMID: 30260008.
23. de Souza Gonçalves B., de Moura Valadares J.M., Alves S.L.G. et al. Evaluation of neuroprotective activity of digoxin and semisynthetic derivatives against partial chemical ischemia. *J Cell Biochem* 2019; 120: 17108–17122. DOI: 10.1002/jcb.28971. PMID: 31310381.
24. Sibarov D.A., Bolshakov A.E., Abushik P.A. et al. Na⁺, K⁺-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na⁺, Ca²⁺ exchanger to prevent Ca²⁺ overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 343: 596–607. DOI: 10.1124/jpet.112.198341. PMID: 22927545.
25. Stelmashook E.V., Weih M., Zorov D. et al. Short-term block of Na⁺/K⁺-ATPase in neuroglial cell cultures of cerebellum induces glutamate dependent damage of granule cells. *FEBS Lett* 1999; 456: 41–44. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00922-9. PMID: 10452526.
26. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Osipova E.A. et al. Ouabain-induced changes in MAP kinase phosphorylation in primary culture of rat cerebellar cells. *Cell Biochem Funct* 2016; 34: 367–377. DOI: 10.1002/cbf.3199. PMID: 27338714.
27. Peng K., Tan D., He M. et al. Studies on cerebral protection of digoxin against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Neuroreport* 2016; 27: 906–915. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000630. PMID: 27362436.
28. de Souza Wyse A.T., Streck E.L., Worm P. et al. Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 2000; 25: 971–975. DOI: 10.1023/a:1007504525301. PMID: 10959493.
29. Watanabe S., Hoffman J.R., Craik R.L. et al. A new model of localized ischemia in rat somatosensory cortex produced by cortical compression. *Stroke* 2001; 32: 2615–2623. DOI: 10.1161/hs1101.097384. PMID: 11692026.
30. rasci Lett 1999; 272: 207–210. DOI: 10.1016/S0304-3940(99)00594-7. PMID: 10505617.
31. Zhai X., Lin H., Chen Y. et al. Hyperbaric oxygen preconditioning ameliorates hypoxia-ischemia brain damage by activating Nrf2 expression in vivo and in vitro. *Free Radic Res* 2016; 50: 454–466. DOI: 10.3109/10715762.2015.1136411. PMID: 26729624.
32. Pylova S.I., Majkowska J., Hilgier W. et al. Rapid decrease of high affinity ouabain binding sites in hippocampal CA1 region following short-term global cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1989; 490: 170–173. DOI: 10.1016/0006-8993(89)90446-0. PMID: 2547499.
33. Nagafuji T., Koide T., Takato M. Neurochemical correlates of selective neuronal loss following cerebral ischemia: role of decreased Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Brain Res* 1992; 571: 265–271. DOI: 10.1016/0006-8993(92)90664-u. PMID: 1535268.
34. Bruer U., Weih M.K., Isaev N.K. et al. Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 1997; 414: 117–121. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00954-x. PMID: 9305743.
35. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Kulichenkova K.N. et al. [The effect of ouabain and bufalin on neurons primary culture of the cerebral cortex of the rat brain under conditions of glucose-oxygen deprivation]. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* 2019; 22(10): 19–24. DOI: 10.29296/25877313-2019-10-03. (In Russ.)
36. Stelmashuk E.V., Isaev N.K., Andreeva N.A., Viktorov I.V. [Ouabain modulates the toxic effect of glutamate in dissociated cultures of granular cells in the rat cerebellum]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* 1996; 122(8): 163–166. PMID: 9081467. (In Russ.)
37. Stelmashuk E.V., Isaev N.K., Genrikhs E.E. et al. [The transient inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity reduces glutamate-induced calcium overload of cultured cerebellar granule cells]. *Asimmetriya* 2018; 12(4): 476–481. DOI: 10.18454/ASY.2018.12.4.016. (In Russ.)
38. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Kulikova O.I., Fedorova T.N. [Ouabain decreases the excitotoxic effect of kainate and the number of kainate KA2 receptors in the primary culture of the rat cortical neurons]. *Asimmetriya* 2019; 13(4): 14–21. DOI: 10.25692/ASY.2019.13.4.002. (In Russ.)
39. Stelmashuk E.V., Isaev N.K., Genrikhs E.E., Khaspekov L.G. [The effect of modulation of Na⁺/K⁺-ATPase activity on viability of cerebellar granule cells exposed to oxidative stress in vitro]. *Annals of Clinical and Experimental Neurology* 2018; 12(4): 52–56. DOI: 10.25692/ACEN.2018.4.7. (In Russ.)
40. Isaev N.K., Stelmashook E.V., Halle A. et al. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity in cultured rats cerebellar granule cells prevents the onset apoptosis induced by low potassium. *Neurosci Lett* 2000; 283: 41–44. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)00903-4. PMID: 10729629.
41. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Nikiforova K.A. et al. [Comparative action of cardiotonic steroids on intracellular processes in rat cortical neurons]. *Biokhimiya* (Mosc) 2018; 83: 140–151. DOI: 10.1134/S0006297918020062. PMID: 29618300.
42. Garcia I.J.P., Kinoshita P.F., Silva L.N.D.E et al. Ouabain attenuates oxidative stress and modulates lipid composition in hippocampus of rats in lipopolysaccharide-induced hippocampal neuroinflammation in rats. *J Cell Biochem* 2019; 120: 4081–4091. DOI: 10.1002/jcb.27693. PMID: 30260008.
43. de Souza Gonçalves B., de Moura Valadares J.M., Alves S.L.G. et al. Evaluation of neuroprotective activity of digoxin and semisynthetic derivatives against partial chemical ischemia. *J Cell Biochem* 2019; 120: 17108–17122. DOI: 10.1002/jcb.28971. PMID: 31310381.
44. Sibarov D.A., Bolshakov A.E., Abushik P.A. et al. Na⁺, K⁺-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na⁺, Ca²⁺ exchanger to prevent Ca²⁺ overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 343: 596–607. DOI: 10.1124/jpet.112.198341. PMID: 22927545.
45. Stelmashook E.V., Weih M., Zorov D. et al. Short-term block of Na⁺/K⁺-ATPase in neuro-glial cell cultures of cerebellum induces glutamate dependent damage of granule cells. *FEBS Lett* 1999; 456: 41–44. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00922-9. PMID: 10452526.
46. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Osipova E.A. et al. Ouabain-induced changes in MAP kinase phosphorylation in primary culture of rat cerebellar cells. *Cell Biochem Funct* 2016; 34: 367–377. DOI: 10.1002/cbf.3199. PMID: 27338714.
47. Peng K., Tan D., He M. et al. Studies on cerebral protection of digoxin against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Neuroreport* 2016; 27: 906–915. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000630. PMID: 27362436.
48. de Souza Wyse A.T., Streck E.L., Worm P. et al. Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 2000; 25: 971–975. DOI: 10.1023/a:1007504525301. PMID: 10959493.
49. Watanabe S., Hoffman J.R., Craik R.L. et al. A new model of localized ischemia in rat somatosensory cortex produced by cortical compression. *Stroke* 2001; 32: 2615–2623. DOI: 10.1161/hs1101.097384. PMID: 11692026.

Информация об авторах

Стельмашук Елена Викторовна — д.б.н., в.н.с. лаб. экспериментальной нейробиологии, отдел исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия.

Генрикс Елизавета Евгеньевна — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальной нейробиологии, отдел исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия.

Исаев Николай Константинович — д.б.н., в.н.с. лаб. экспериментальной нейробиологии, отдел исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия; доц. каф. клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

Новикова Светлана Викторовна — м.н.с. лаб. экспериментальной нейробиологии отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия.

Хаспеков Леонид Георгиевич — д.б.н., зав. лаб. экспериментальной нейробиологии, отдел исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия.

Information about the authors

Elena V. Stelmashook — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of experimental neurocytology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia.

Elizaveta E. Genrikhs — PhD. (Biol.), senior researcher, Laboratory of experimental neurocytology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia.

Nikolay K. Isaev — D. Sci. (Biol), leading researcher, Laboratory of experimental neurocytology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia; Department of cell biology and histology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

Svetlana V. Novikova — junior researcher, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia.

Leonid G. Khaspekov — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental neurocytology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia.