

# Карнозин восстанавливает активацию сигнальных каскадов и соотношение белков-регуляторов апоптоза в приочаговой зоне при необратимой фокальной ишемии мозга у крыс

О.М. Лопачева<sup>1</sup>, А.В. Лопачев<sup>1</sup>, К.Н. Куличенкова<sup>1</sup>, А.А. Девятков<sup>1</sup>, Д.С. Бережной<sup>1</sup>,  
С.Л. Стволинский<sup>1</sup>, О.И. Куликова<sup>1</sup>, С.А. Гаврилова<sup>2</sup>, М.П. Морозова<sup>2</sup>, Т.Н. Федорова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Введение.** Ишемический инсульт — одно из самых распространенных и социально значимых заболеваний, в патогенезе которого важная роль отводится окислительному стрессу. Изучение механизмов нейропротекторного действия природного антиоксиданта карнозина представляется перспективным для разработки лекарственных препаратов на его основе.

**Цель исследования.** Изучение влияния карнозина на уровень белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2 и уровень активации протеинкиназы B (Akt) и MAP киназ ERK1/2, p38 и JNK в мозге крыс, перенесших 24-часовую необратимую фокальную ишемию мозга.

**Материалы и методы.** В модели необратимой фокальной ишемии головного мозга, вызванной окклюзией средней мозговой артерии, у крыс линии Wistar методом вестерн-блоттинга оценивали уровень экспрессии белков семейства Bcl-2 и фосфорилирования киназ Akt, ERK1/2, p38 и JNK в приочаговой зоне коры ишемизированного полушария и симметричного участка контрлатерального полушария, а также аналогичных участков мозга интактных животных. Карнозин вводили животным внутривенно в дозах 50 мг/кг и 500 мг/кг массы тела в постишемическом периоде.

**Результаты.** При необратимой фокальной ишемии головного мозга у крыс в приочаговой зоне повышалось количество Bax и, в меньшей степени, Bcl-2, смещая соотношение Bcl-2/Bax в сторону проапоптотического сигнала, а также наблюдалось снижение активации Akt и рост активации ERK1/2. Введение карнозина восстанавливало уровень активации Akt и соотношение Bcl-2/Bax, однако не влияло на повышенную активацию ERK1/2. Существенных изменений уровня белков Bax, Bcl-xL и Bcl-w и активации киназ p38 и JNK в приочаговой зоне не было обнаружено.

**Заключение.** Нейропротекторное действие карнозина в условиях необратимой фокальной ишемии головного мозга у крыс сопровождается восстановлением активации Akt и соотношения Bcl-2/Bax в приочаговой зоне до уровня, наблюдаемого у интактных животных, что препятствует развитию апоптоза.

**Ключевые слова:** карнозин, необратимая фокальная ишемия головного мозга, приочаговая зона, семейство Bcl-2, Akt, MAP киназы.

**Для цитирования:** Лопачева О.М., Лопачев А.В., Куличенкова К.Н. и др. Карнозин восстанавливает активацию сигнальных каскадов и соотношение белков-регуляторов апоптоза в приочаговой зоне при необратимой фокальной ишемии мозга у крыс. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2018; 12(1): 38–49.

DOI: 10.25692/ACEN.2018.1.6

## Carnosine restores the activation of signaling cascades and the ratio of apoptosis-regulating proteins in the penumbra zone after a permanent focal cerebral ischemia in rats

Olga M. Lopacheva<sup>1</sup>, Alexander V. Lopachev<sup>1</sup>, Kseniya N. Kulichenkova<sup>1</sup>, Alexander A. Devyatov<sup>1</sup>, Daniil S. Bereznoy<sup>1</sup>, Sergey L. Stvolinsky<sup>1</sup>,  
Olga I. Kulikova<sup>1</sup>, Svetlana A. Gavrilova<sup>2</sup>, Mariya P. Morozova<sup>2</sup>, Tatiana N. Fedorova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center of Neurology, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Introduction.** Ischemic stroke is one of the most common and socially significant diseases, and its pathogenesis is associated with oxidative stress. The study of mechanisms of the neuroprotective action of the natural antioxidant carnosine is promising in the context of carnosine-based drug development.

**Objective.** To study the effect of carnosine on the level of apoptosis-regulating proteins of the Bcl-2 family and the level of activation of protein kinase B (Akt) and MAP kinases ERK1/2, p38 and JNK in the rat brain after a 24-hour permanent focal cerebral ischemia.

**Materials and methods.** In the model of permanent focal cerebral ischemia caused by the occlusion of the middle cerebral artery in Wistar rats, we assessed, using Western blotting, the level of expression of Bcl-2 family proteins and the phosphorylation of Akt, ERK1/2, p38 and JNK in the penumbra zone of the cortex in the ischemic hemisphere and in the symmetrical region of the contralateral hemisphere, as well as in similar areas of the brain of intact animals. Carnosine was administered to animals intraperitoneally at doses of 50 mg/kg and 500 mg/kg of body weight in the postischemic period.

**Results.** In permanent focal cerebral ischemia in rats, the amount of Bax and, to a lesser extent, of Bcl-2 increased in the penumbra zone shifting the Bcl-2/Bax ratio towards the pro-apoptotic signal; a decreased Akt activation and an increased ERK1/2 activation was observed. The administration of carnosine rescued the activation of Akt and the Bcl-2/Bax ratio but did not affect an increased activation of ERK1/2. No significant changes in the level of Bak, Bcl-xL and Bcl-w, and no activation of p38 and JNK were observed in the penumbra zone.

**Conclusion.** The neuroprotective effect of carnosine in permanent focal cerebral ischemia in rats is accompanied by the restoration of Akt activation and the Bcl-2/Bax ratio in the penumbra zone to the levels observed in intact animals, and this effect prevents the development of apoptosis.

**Keywords:** carnosine, permanent focal cerebral ischemia, ischemic penumbra, Bcl-2 family, Akt, MAP kinases.

**For citation:** Lopacheva O.M., Lopachev A.V., Kulichenkova K.N. et al. [Carnosine restores the activation of signaling cascades and the ratio of apoptosis-regulating proteins in the penumbra zone after a permanent focal cerebral ischemia in rats]. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2018; 12(1): 38–49. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2018.1.6

## Введение

Ишемический инсульт — одно из самых распространенных и социально значимых заболеваний, в молекулярных механизмах которого важная роль отводится окислительному стрессу (ОС) [1–3]. Недостаток кислорода в мозге вызывает повышение содержания эксайтотоксических аминокислот во внеклеточном пространстве, гиперактивацию внесинаптических NMDA-рецепторов, следствием чего является нарушение мембранного потенциала и чрезмерное увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме нейронов. Это в свою очередь приводит к ОС, дальнейшее развитие которого может индуцировать митохондриальную дисфункцию и связанный с ней апоптоз [4–7]. В стрессовых условиях, когда активность эндогенной антиоксидантной системы клетки снижается, целесообразно применение препаратов, способных препятствовать чрезмерному повышению уровня активных форм кислорода (АФК) внутри клеток и дальнейшему развитию ОС [8]. Однако, несмотря на успешность экспериментальных исследований, антиоксидантная терапия ишемического инсульта не показала клинической эффективности.

Перспективным природным антиоксидантом является дипептид карнозин ( $\beta$ -аланин-L-гистидин), характеризующийся широким спектром биологического действия [9, 10]. Карнозин рассматривают как модулятор активности эндогенной антиоксидантной системы [9]. Его нейропротекторная эффективность была выявлена на различных экспериментальных моделях заболеваний ЦНС, в том числе глобальной и фокальной ишемии мозга грызунов, преимущественно при его профилактическом применении в высоких дозах (до 2 г/кг массы тела) [11–14]. В недавно проведенном в нашей лаборатории исследовании было впервые показано, что низкие суточные дозы карнозина при его введении в постинсультном периоде также способны оказывать нейропротекторное действие. При введении животным карнозина в суточной дозе 50 или 500 мг/кг массы тела в условиях постоянной 72 ч фокальной ишемии площадь очага ишемического повреждения уменьшалась на 27% и 39% соответственно [15]. Нейропротекторный эффект карнозина в мозге экспериментальных животных обеспечивается его способностью проходить через гематоэнцефалический барьер [16] и проникать внутрь нейронов за счет наличия в них трансмембранного переносчика коротких пептидов PEPT2 [17]. Однако молекулярные механизмы действия карнозина в условиях фокальной ишемии мозга остаются недостаточно изученными.

Важными участниками ишемического повреждения мозга и эксайтотоксической гибели нейронов являются проапоптотические белки семейства Bcl-2 [18]. Данные белки образуют поры во внешней мембране митохондрий, что приводит к выходу в цитоплазму цитохрома C и связыванию с белком Araf-1, который активирует каспазу 9, запускающую апоптоз через эффекторные каспазы 3/7 [19]. Основными проапоптотическими белками семейства Bcl-2, активирующимися при ишемии мозга, являются Bax [20] и Bak [21]. Одновременно снижается количество ингибирующих их активность антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-w [18, 20]. Основными регуляторами баланса про- и антиапоптотических белков при ишемии мозга являются киназы Akt (протеинкиназа B, PKB) [18, 22] и MAP киназы (MAPK) ERK1/2, p38 и JNK [23]. Известно, что при фокальной ишемии снижается активность Akt [23], в то время как эффективные нейропротекторы или ишемическое preconditionирование за счет повышения активации Akt предотвращают эксайтотоксическую гибель нейронов [24]. Три MAP киназы — ERK1/2, p38 и JNK — активируются при ишемии головного мозга. JNK работает как проапоптотическая киназа. p38 имеет двойное действие: с одной стороны, запускает выделение провоспалительных цитокинов, с другой — активирует транскрипционный фактор CREB, который в свою очередь активирует антиапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-xL. ERK1/2 также активирует CREB, и, кроме того, фосфорилирует p90PSK, который фосфорилирует и блокирует проапоптотический белок Bad [23, 25, 26].

Для разработки лекарственных препаратов на основе карнозина важное значение имеет исследование его влияния на работу перечисленных белков, связанных с регуляцией апоптоза при ишемии мозга. Поэтому целью данной работы стала оценка влияния карнозина на уровень белков-регуляторов митохондриального пути апоптоза семейства Bcl-2 (Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) и активацию сигнальных каскадов Akt и MAPK.

## Материалы и методы

**Экспериментальные животные.** Все исследования на животных выполнялись согласно «Руководству по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» [27]. Эксперименты были выполнены на 48 самцах крыс линии Wistar весом 300–350 г. Животных содержали на стандартном гранулированном корме в вентилируемом виварии с режимом освещения

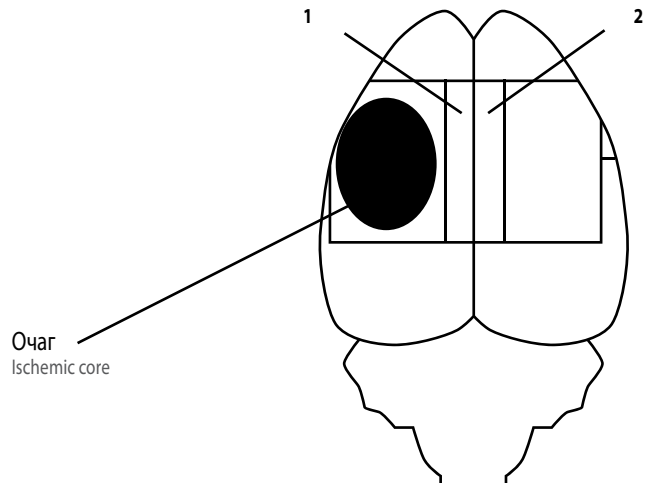
12 час день/12 час ночь при температуре  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  и свободном доступе к воде и пище.

**Моделирование необратимой фокальной ишемии головного мозга у крыс.** Перед операцией животных наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг массы тела, внутривенно). Необратимую фокальную ишемию мозга продолжительностью 24 час моделировали с помощью электрокоагуляции левой ветви средней мозговой артерии (проксимальнее места ее бифуркации на фронтальную и париетальную ветви), а также прилежащей к ней вены с одновременной перевязкой ипсилатеральной сонной артерии. Начало ишемии регистрировали визуально по прекращению кровотока в ветвях средне-мозговой артерии дистальнее места коагуляции. Животных, у которых регистрировалась геморагия или у которых не удавалось прервать кровоток, выводили из эксперимента. Оперированных животных помещали на подогреваемый столик до выхода из наркоза [28, 29].

Крысы были разделены на 4 группы по 12 животных: 1 группа – интактные крысы; 2 группа – крысы, перенесшие окклюзию средней мозговой артерии (ОСМА), с последующим внутривенным (в/в) введением физиологического раствора (контроль); 3 группа – крысы, перенесшие ОСМА, с последующим в/в введением карнозина в дозе 50 мг/кг массы тела; 4 группа – крысы, перенесшие ОСМА, с последующим в/в введением карнозина в дозе 500 мг/кг массы тела.

Карнозин вводили по следующей схеме: через 15 мин после операции животные получали 50% дозы карнозина, затем через 2 час 15 мин вводили еще половину дозы. Контрольным животным по аналогичной схеме вводили физиологический раствор. Через 24 час после операции животных декапитировали, извлекали мозг и при  $0^\circ\text{C}$  выделяли прилегающую к очагу ишемического повреждения зону коры ишемизированного полушария и симметричный участок контрлатерального полушария мозга (рис. 1). У интактных животных выделяли аналогичные по расположению участки коры больших полушарий. Образцы ткани замораживали в жидком азоте, хранили при  $-80^\circ\text{C}$  и затем использовали для оценки уровня экспрессии про- и антиапоптотических белков и фосфорилирования исследуемых киназ методом вестерн-блоттинга.

**Вестерн-блоттинг.** Полученные образцы ткани мозга лизировали в RIPA буфере (Sigma, США), содержащем коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma). Лизат центрифугировали при  $12000g$  в течение 10 мин, затем отбирали супернатант. Концентрацию белка в пробах измеряли с помощью набора реактивов DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, США). Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли, перенесли на PVDF-мембрану Westran Clear Signal (Whatman, Великобритания) и проводили окрашивание антителами в соответствии с рекомендациями производителей. Были использованы первичные антитела к Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Akt, p-Akt, p38 (Cell Signaling Technology, США), p-p38, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK и  $\beta$ -актину (Santa Cruz Biotechnology, США), а также вторичные антитела anti-goat, anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology) и anti-mouse (Cell Signaling Technology), конъюгированные с пероксидазой хрена. Мембраны проявляли при помощи хемилюминесцентного субстрата Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate или Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, США).



**Рис. 1. Схема отбора образцов ткани мозга:**  
1 – приочаговая зона; 2 – симметричная зона контрлатерального полушария

**Fig. 1. Scheme for obtaining brain tissue samples:**  
1 – ischemic penumbra zone; 2 – the symmetric zone of the contralateral hemisphere

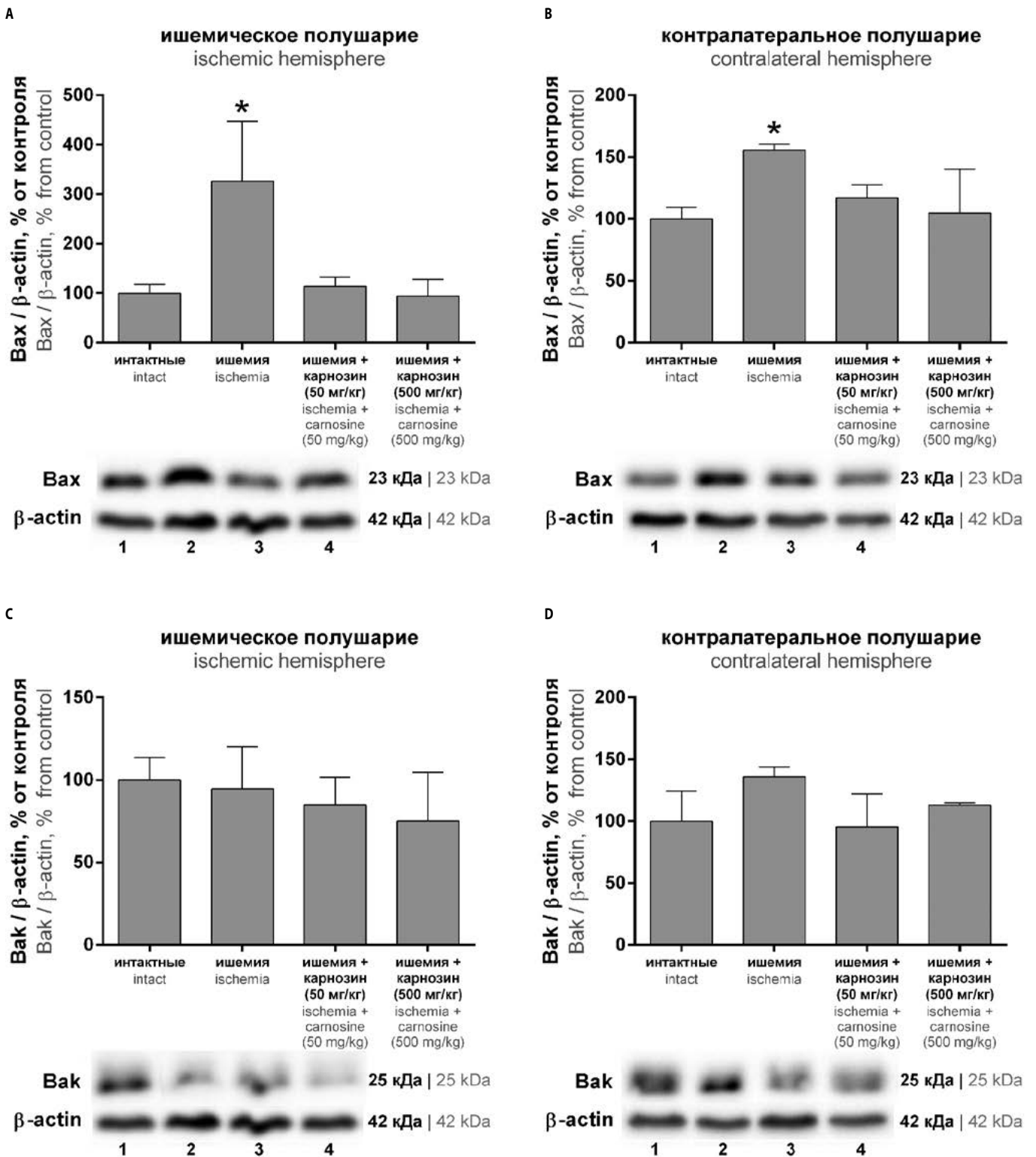
Люминесценцию полос детектировали при помощи системы гель-документирования ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad), интенсивность обсчитывали при помощи программы Image Lab 3.0 (Bio-Rad). Уровень экспрессии белков семейства Bcl-2 оценивали по отношению интенсивности полос исследуемого белка к интенсивности полос  $\beta$ -актина. Активацию киназ оценивали по уровню фосфорилирования, т.е. отношению интенсивности полос фосфорилированной формы киназы к интенсивности ее общей формы.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 10.0. Для определения достоверности различий использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считались достоверными при значении  $p < 0,05$ . Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

## Результаты

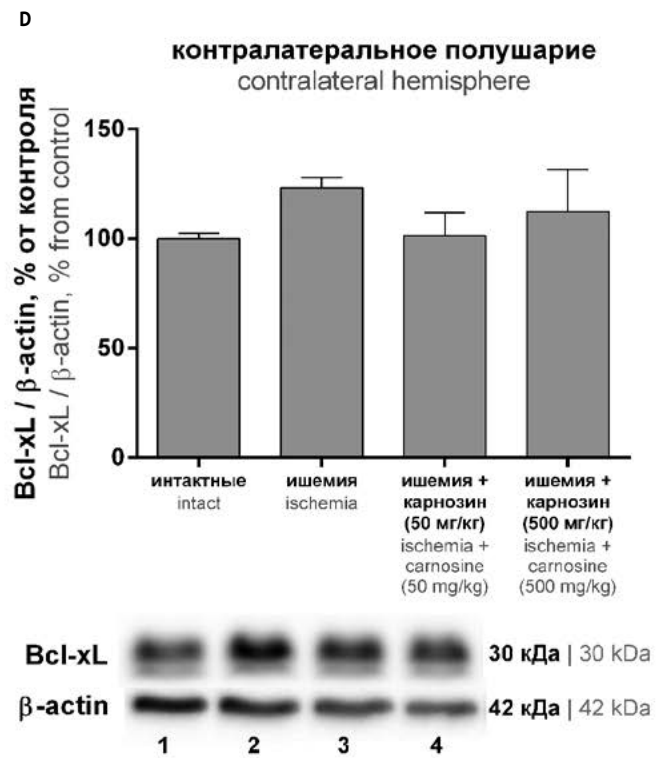
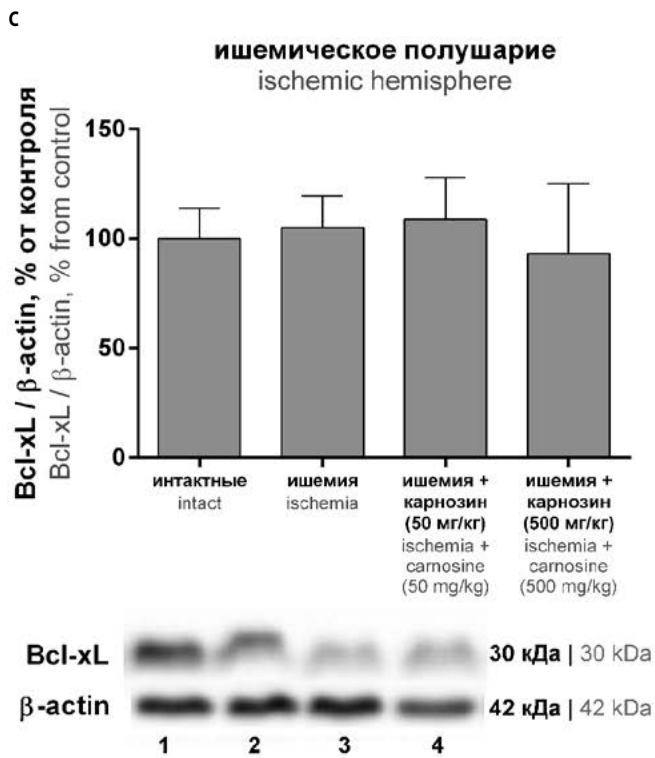
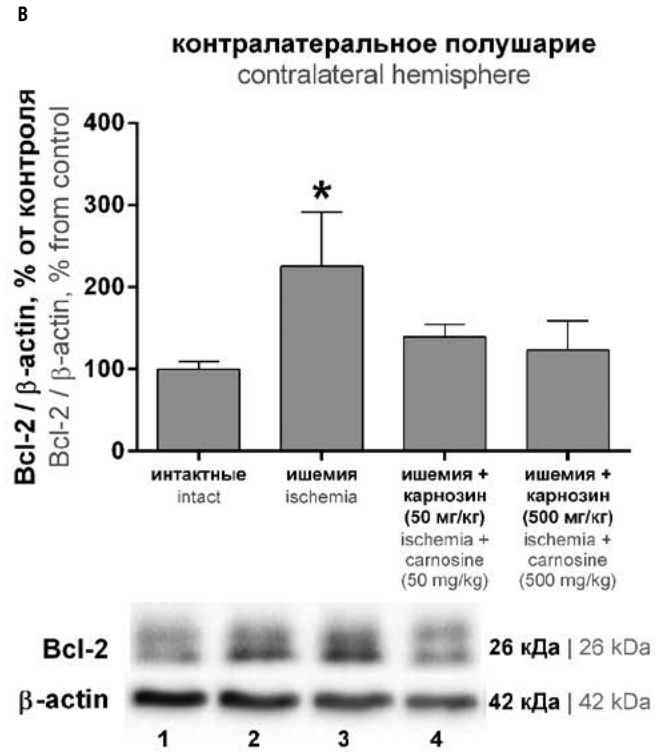
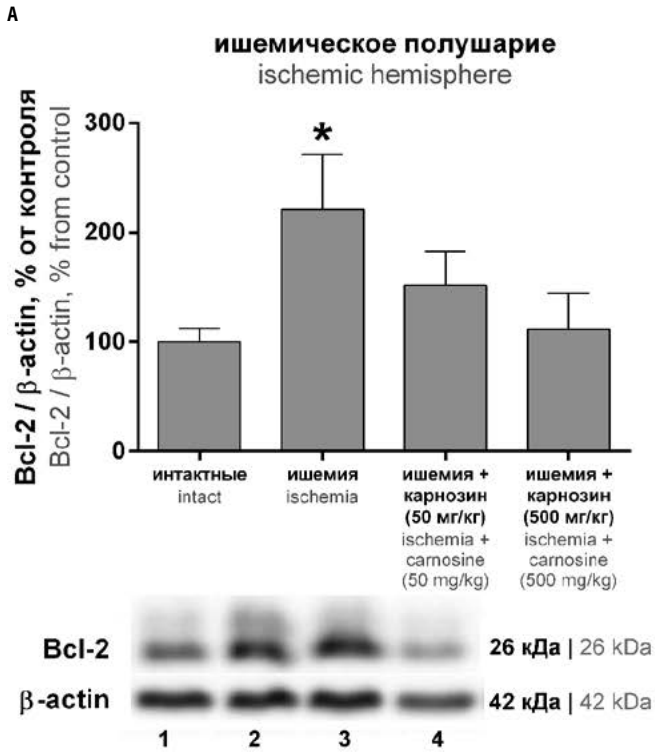
**Влияние карнозина на уровень белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2.** Исходя из того, что карнозин уменьшает площадь очага ишемического повреждения ткани мозга, мы предположили, что его эффект может выражаться через ингибирование митохондриального пути апоптоза в нейронах, который запускается в приочаговой зоне [30, 31] проапоптотическими белками семейства Bcl-2: Bax, Bak [20, 21] на фоне уменьшения уровня блокаторов их активности – антиапоптотических белков семейства Bcl-2: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w [19, 32]. В зоне, прилегающей к ишемическому очагу, и в соответствующей зоне контрлатерального полушария при помощи вестерн-блоттинга было проведено сравнение количества проапоптотических белков Bax и Bak, а также антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-w между группами животных с фокальной ишемией без введения карнозина и с введением карнозина в дозах 50 мг/кг и 500 мг/кг массы тела, а также в соответствующих участках мозга интактных животных.

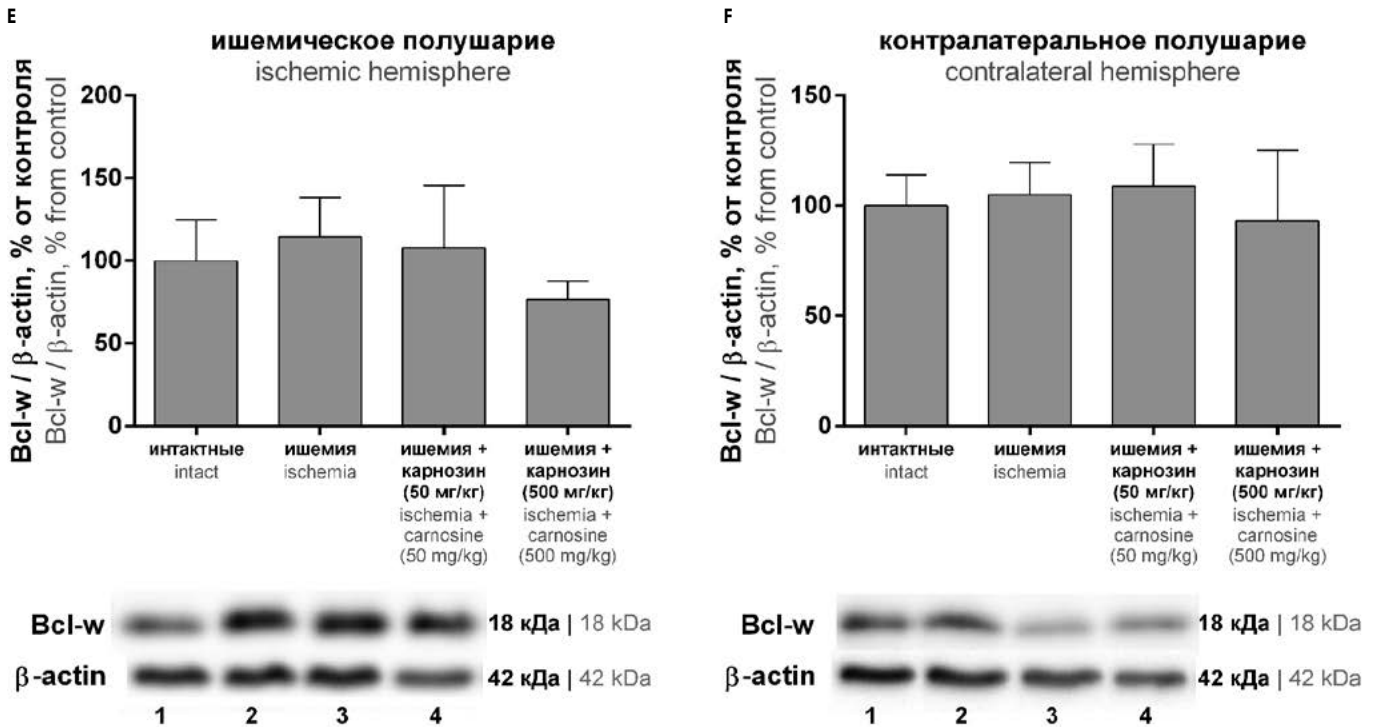
Как видно из рис. 2А, В, при фокальной ишемии в исследованных участках коры головного мозга увеличивается



**Рис. 2. Влияние карнозина на уровень проапоптотических белков в модели необратимой фокальной ишемии головного мозга у крыс**  
 А – Bax, ишемическое полушарие; В – Bax, контралатеральное полушарие; С – Bak, ишемическое полушарие; D – Bak, контралатеральное полушарие  
 1 – интактные животные; 2 – ишемия; 3 – ишемия + карнозин (50 мг/кг); 4 – ишемия + карнозин (500 мг/кг); \* –  $p < 0,05$  по сравнению с интактной группой

**Fig. 2. Effect of carnosine on the level of proapoptotic proteins in the model of irreversible focal brain ischemia in rats**  
 A – Bax, the ischemic hemisphere; B – Bax, the contralateral hemisphere; C – Bak, the ischemic hemisphere; D – Bak, the contralateral hemisphere  
 1 – intact animals; 2 – ischemia; 3 – ischemia + carnosine (50 mg/kg); 4 – ischemia + carnosine (500 mg/kg); \* –  $p < 0.05$  compared to the intact group





**Рис. 3. Влияние карнозина на уровень антиапоптотических белков в модели необратимой фокальной ишемии головного мозга у крыс**  
 А – Bcl-2, ишемическое полушарие; В – Bcl-2, контрлатеральное полушарие; С – Bcl-xL, ишемическое полушарие; D – Bcl-xL, контрлатеральное полушарие; E – Bcl-w, ишемическое полушарие; F – Bcl-w, контрлатеральное полушарие  
 1 – интактные животные; 2 – ишемия; 3 – ишемия + карнозин (50 мг/кг); 4 – ишемия + карнозин (500 мг/кг); \* –  $p < 0,05$  по сравнению с интактной группой

**Fig. 3. Effect of carnosine on the level of antiapoptotic proteins in the model of irreversible focal brain ischemia in rats**  
 A – Bcl-2, the ischemic hemisphere; B – Bcl-2, the contralateral hemisphere; C – Bcl-xL, the ischemic hemisphere; D – Bcl-xL, the contralateral hemisphere; E – Bcl-w, the ischemic hemisphere; F – Bcl-w, the contralateral hemisphere  
 1 – intact animals; 2 – ischemia; 3 – ischemia + carnosine (50 mg/kg); 4 – ischemia + carnosine (500 mg/kg); \* –  $p < 0.05$  compared to the intact group

количество проапоптотического белка Вах на 230% в ишемическом полушарии и на 56% в контрлатеральном полушарии. Карнозин в исследованных дозах препятствует росту количества Вах как в ишемическом, так и в контрлатеральном полушариях (рис. 2А, В), снижая его до уровня в соответствующем участке мозга интактных животных. При этом значительных изменений количества белка Вах не наблюдается ни в одной из экспериментальных групп (рис. 2С, D).

Также мы оценили изменение относительного количества антиапоптотических белков семейства Bcl-2: Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-w в зоне, прилегающей к ишемическому очагу и соответствующей зоне контрлатерального полушария, а также в соответствующих зонах мозга интактных животных. Относительное количество антиапоптотического белка Bcl-2 как в ишемизированном, так и в контрлатеральном полушариях повышалось на 120% в группе животных с ишемией относительно интактной группы, в то время как у крыс, получавших карнозин в дозах 50 мг/кг и 500 мг/кг массы тела, относительное количество Bcl-2 не отличалось от его содержания у интактных животных (рис. 3А, В). Относительное количество Bcl-xL и Bcl-w достоверно не изменялось в ипсилатеральном и контрлатеральном полушариях ни в группе ишемизированных животных без введения карнозина, ни в группах с его введением (рис. 3С–F).

**Влияние карнозина на активацию киназы Akt.** Поскольку важную роль в ингибировании митохондриального пути апоптоза играет киназа Akt [22, 24], мы исследовали уро-

вень ее активации в зоне, прилегающей к ишемическому очагу, и в контрлатеральном полушарии животных через 24 час после операции, а также в соответствующих зонах мозга интактных животных. Фокальная ишемия приводила к снижению уровня активации Akt на 60% в зоне, прилегающей к ишемическому очагу, относительно интактной группы (рис. 4А), в то время как в соответствующей зоне контрлатерального полушария не происходило значительного изменения активации Akt (рис. 4В). Карнозин в дозах 50 мг/кг и 500 мг/кг восстанавливал уровень активации Akt до контрольного в зоне, прилегающей к ишемическому очагу.

**Влияние карнозина на активацию MAP киназ.** Поскольку карнозин восстанавливал соотношение проапоптотических и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в зоне, прилегающей к ишемическому очагу, было целесообразно оценить его влияние на сигнальные механизмы, регулирующие количество проапоптотических и антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Мы исследовали уровень активации MAP-киназных сигнальных путей (ERK1/2, p38, JNK) в зоне, прилегающей к ишемическому очагу, в контрлатеральном полушарии животных через 24 час после операции, а также в соответствующих зонах мозга интактных животных. Как видно из рис. 5А, фокальная ишемия приводила к увеличению активации киназы ERK1/2 на 280% по сравнению с интактной группой в зоне, прилегающей к ишемическому очагу, и на 150% – в симметричной зоне контрлатерального полушария (рис. 5В). При этом карнозин в дозах 50 мг/кг и 500 мг/кг массы тела не оказывал

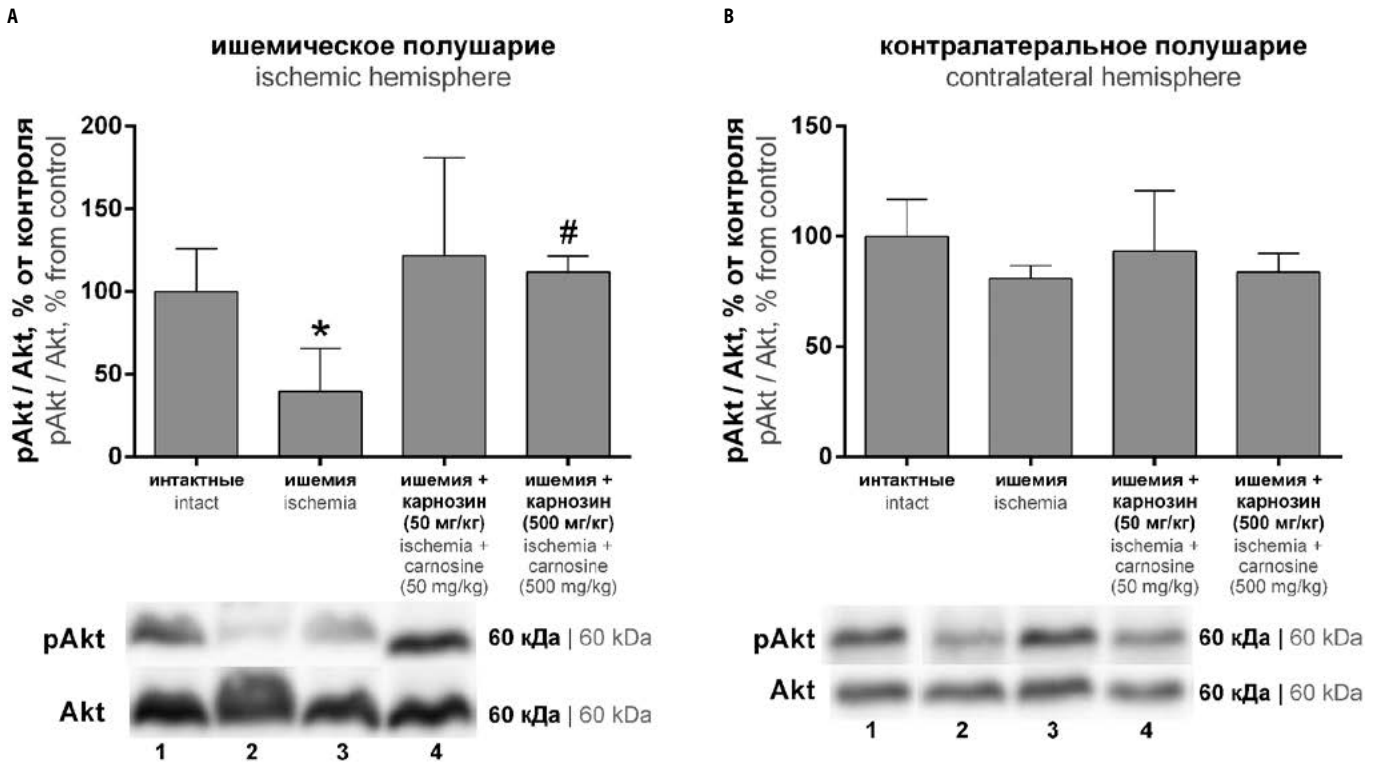
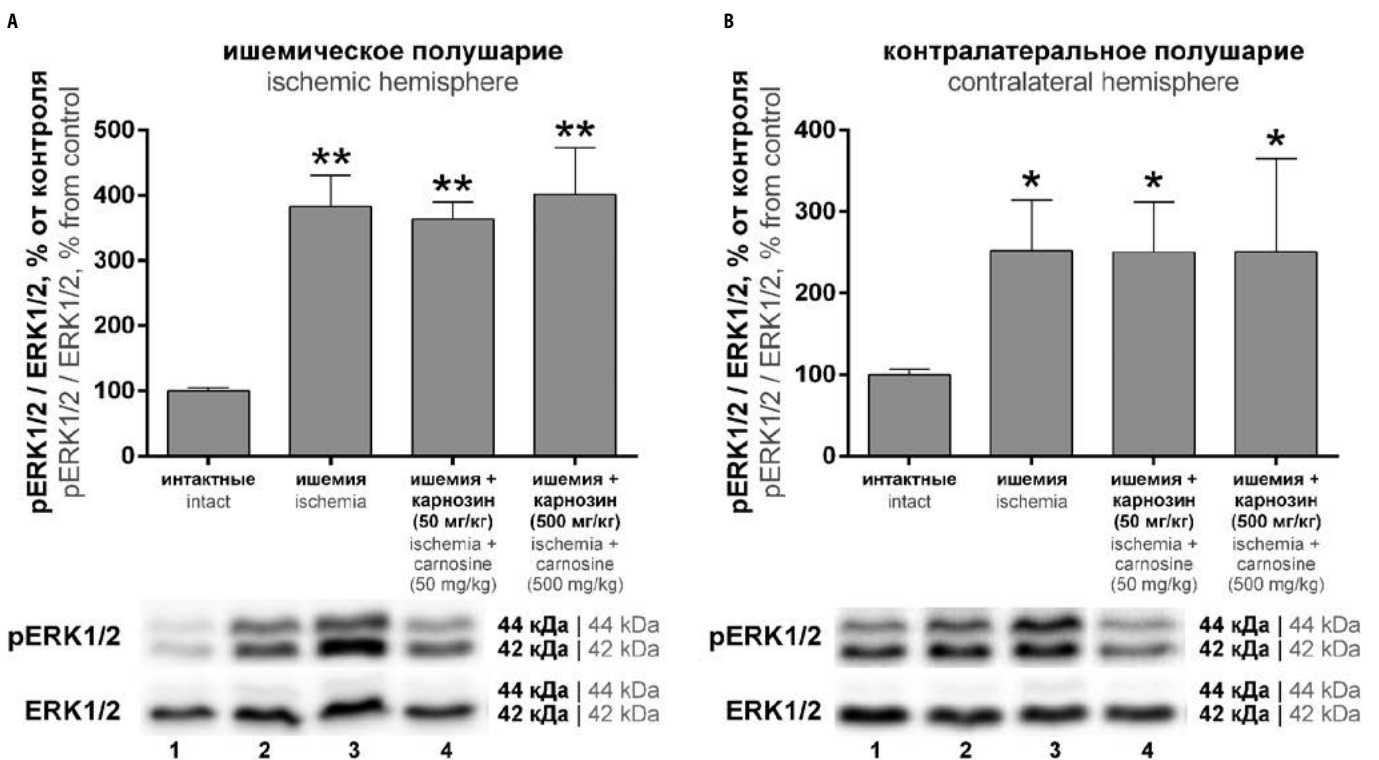


Рис. 4. Влияние карнозина на уровень фосфорилирования киназы Akt в модели необратимой фокальной ишемии головного мозга у крыс  
А – ишемическое полушарие; В – контралатеральное полушарие  
1 – интактные животные; 2 – ишемия; 3 – ишемия + карнозин (50 мг/кг); 4 – ишемия + карнозин (500 мг/кг); \* –  $p < 0,05$  по сравнению с интактной группой; # –  $p < 0,05$  по сравнению с группой ишемии

Fig. 4. Effect of carnosine on the level of Akt phosphorylation in the model of irreversible focal brain ischemia in rats  
А – the ischemic hemisphere; В – the contralateral hemisphere  
1 – intact animals; 2 – ischemia; 3 – ischemia + carnosine (50 mg/kg); 4 – ischemia + carnosine (500 mg/kg); \* –  $p < 0.05$  compared to the intact group; # –  $p < 0.05$  compared to the ischemia group



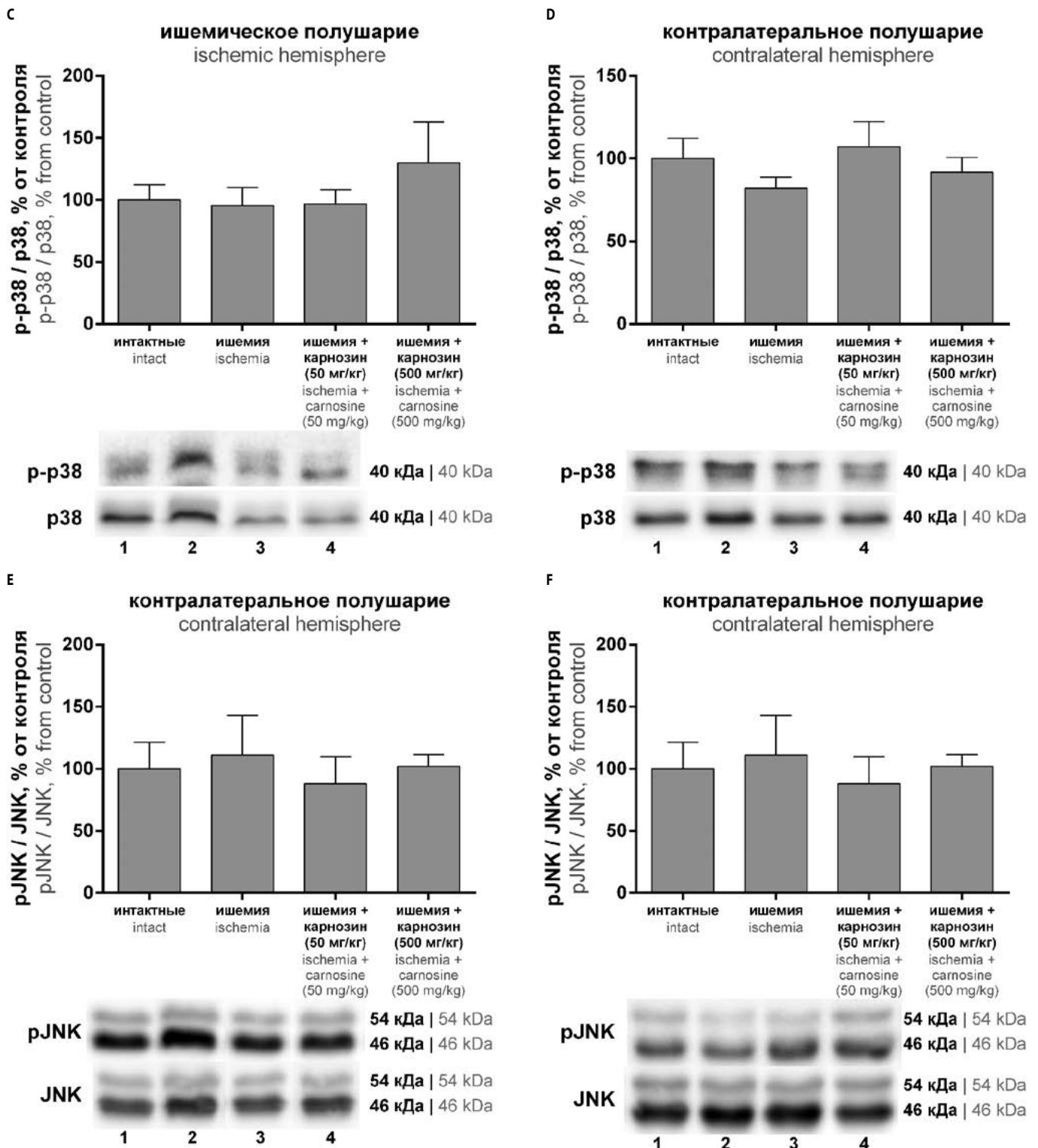


Рис. 5. Влияние карнозина на уровень фосфорилирования MAP киназ в модели необратимой фокальной ишемии головного мозга у крыс  
А – ERK1/2, ишемическое полушарие; В – ERK1/2, контралатеральное полушарие; С – p38, ишемическое полушарие; D – p38, контралатеральное полушарие; E – JNK, ишемическое полушарие; F – JNK, контралатеральное полушарие  
1 – интактные животные; 2 – ишемия; 3 – ишемия + карнозин (50 мг/кг); 4 – ишемия + карнозин (500 мг/кг); \* –  $p < 0,05$  по сравнению с интактной группой; \*\* –  $p < 0,01$  по сравнению с интактной группой.

Fig. 5. Effect of carnosine on the level of MAP kinase phosphorylation in the model of irreversible focal brain ischemia in rats  
A – ERK1/2, the ischemic hemisphere; B – ERK1/2, the contralateral hemisphere; C – p38, the ischemic hemisphere; D – p38, the contralateral hemisphere; E – JNK, the ischemic hemisphere; F – JNK, the contralateral hemisphere  
1 – intact animals; 2 – ischemia; 3 – ischemia + carnosine (50 mg/kg); 4 – ischemia + carnosine (500 mg/kg); \* –  $p < 0.05$  compared to the intact group; \*\* –  $p < 0.01$  compared to the intact group



влияния на уровень активации ERK1/2 у ишемизированных животных (рис. 5А, В). В зоне, прилежащей к ишемическому очагу, и в соответствующей зоне контрлатерального полушария животных, перенесших фокальную ишемию, через 24 час не наблюдалось изменений активации p38 и JNK по сравнению с соответствующими участками мозга интактных животных (рис. 5С–F).

## Обсуждение

Ранее в наших исследованиях было показано, что при моделировании постоянной фокальной ишемии в бассейне средней мозговой артерии у крыс введение карнозина в суточной дозе 50 мг/кг и 500 мг/кг оказывало нейропротекторное действие, обеспечивая значительное снижение площади очага ишемического повреждения, формирующегося в течение 72 час после операции [15]. Поскольку задачей данного исследования было выяснение механизмов нейропротекторного действия карнозина, мы выбрали время 24 час после операции, когда очаг вторичного повреждения еще не сформирован полностью. Ранее нами было показано, что через 24 час после операции карнозин в дозе 50 мг/кг и 500 мг/кг оказывает существенное влияние на состояние окислительного статуса в приочаговой зоне коры головного мозга крыс, снижая уровень образующихся липидных гидроперекисей и увеличивая общую антиоксидантную активность ткани мозга (в печати). В настоящем исследовании мы выявили внутриклеточные сигнальные каскады, сопровождающие нейропротекторный эффект карнозина в данной модели. Мы показали, что через 24 час после ОСМА карнозин восстанавливает соотношение проапоптотического белка Вах и антиапоптотического белка Bcl-2, регулирующих митохондриальный путь апоптоза при ишемии мозга [18, 20, 33]. В ипсилатеральном полушарии при ишемии увеличивалось относительное количество как Вах (на 230%), так и Bcl-2 (на 120%), при этом соотношение этих белков смещалось в сторону проапоптотического сигнала. В контрлатеральном полушарии также наблюдался рост относительного количества как Вах, так и Bcl-2, но при этом соотношение Bcl-2/Вах изменялось в пользу антиапоптотического сигнала. Увеличение количества Bcl-2 вслед за Вах, согласно литературе, является адаптивным механизмом защиты нейронов после ишемии [34], однако то, запустится ли механизм апоптоза, зависит от изменения соотношения количества данных белков [35]. В использованной модели карнозин в дозах 50 мг/кг и 500 мг/кг массы тела восстанавливал в приочаговой зоне соотношение данных белков, препятствующее развитию апоптоза.

В нашем исследовании при ишемии не было обнаружено значительных изменений количества проапоптотического белка Вах и антиапоптотических белков Bcl-xL и Bcl-w ни в ипсилатеральном, ни в контрлатеральном полушариях. В литературе есть сведения, что при ишемии головного мозга увеличивается экспрессия как Bcl-xL, так и Вах [18, 20, 21]. В других исследованиях было показано, что при фокальной ишемии увеличивается относительное количество Вах [21] и уменьшается Bcl-xL [18]. Однако в данных работах результаты были получены на модели кратковременной ишемии [36]. В использованной нами модели введение карнозина в постишемическом периоде не повлияло на уровень Вах, Bcl-xL и Bcl-w в приочаговой зоне и в симметричном участке коры контрлатерального полушария.

Активность и экспрессия проапоптотических и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 регулируется внутри-

клеточными сигнальными каскадами [19]. В использованной нами модели при ишемии происходило существенное уменьшение активации Akt-киназы, связанной с поддержанием жизнеспособности нейронов [22, 24], что согласуется с результатами других исследований в моделях фокальной ишемии на животных [37]. Введение карнозина приводило к восстановлению активации Akt до уровня, наблюдаемого у интактных животных. В другом исследовании ишемическое посткондиционирование в моделях ишемии головного мозга также было связано с сохранением активации Akt [37].

Наконец, мы исследовали влияние карнозина на активацию MAP киназ ERK1/2, p38 и JNK – участников быстрого ответа на стресс, вызываемый ишемией в нейронах [23]. ERK1/2 может активироваться в нейронах в ответ на стрессовые состояния [38, 39] и деполяризацию [40], в том числе эксайтотоксический стресс [41]. В целом активация ERK1/2 способна оказывать антиапоптотическое действие в нейронах [42]. Однако при продолжительной активации ее роль в регуляции жизнеспособности нейронов неоднозначна [41, 43]. В нашем исследовании нейропротекторное действие карнозина в условиях 24 час ишемии оказалось не связано напрямую с активацией ERK1/2. Повышенная активация ERK1/2 как в ипсилатеральном, так и в контрлатеральном полушариях мозга может быть связана с общим стрессовым воздействием перенесенной фокальной ишемии на мозг животных. То, что в нашем исследовании ни ишемия, ни карнозин не оказывали влияния на активацию p38 и JNK, может быть связано с тем, что мы исследовали механизмы ответа данных сигнальных каскадов через 24 час после ОСМА, в то время как рост активации p38 и JNK связан с гибелью нейронов при меньших временах после ишемии [44].

Из данного исследования можно заключить, что нейропротекторная эффективность карнозина при фокальной ишемии мозга связана с его способностью препятствовать изменению соотношения про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, в особенности Вах и Bcl-2, а также уменьшению активации киназы Akt, регулирующей соотношение и активность данных белков.

При прохождении в мозг через гематоэнцефалический барьер карнозин может непосредственно участвовать в предотвращении развития ОС как во внеклеточном пространстве, так и благодаря активности белка-транспортера РЕРТ2 внутри клеток, где продукция АФК запускает киназные каскады, влияющие на баланс про- и антиапоптотических белков. Можно полагать, что антиоксидантный механизм нейропротекторного действия карнозина в условиях фокальной ишемии мозга является одним из ведущих факторов регуляции баланса про- и антиапоптотических белков.

Таким образом, впервые на экспериментальной модели необратимой фокальной ишемии мозга у крыс охарактеризованы ключевые молекулярные механизмы действия карнозина при введении в постишемическом периоде, что представляется перспективным для разработки нейропротекторных лекарственных средств с использованием карнозина в качестве активного вещества.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare there is no conflict of interest.*

## Список литературы

1. Пирадов М.А., Танащян М.М., Домашенко М.А. и др. Нейропротекция при цереброваскулярных заболеваниях: поиск жизни на Марсе или перспективное направление лечения? Часть 1. Острые нарушения мозгового кровообращения. *Анналы клин. и эксперим. неврологии* 2015; 9(1): 41–50.
2. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381): 1309–1312. PMID: 9721092.
3. Niizuma K., Endo H., Chan P.H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem* 2009; 109 Suppl 1: 133–138. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.05897.x. PMID: 19393019.
4. Atlante A., Calissano P., Bobba A. et al. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* 2001; 497(1): 1–5. PMID: 11376653.
5. Babot Z., Cristofol R., Sunol C. Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABA<sub>A</sub> receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci* 2005; 21(1): 103–112. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03848.x. PMID: 15654847.
6. Lu Y.M., Yin H.Z., Chiang J., Weiss J.H. Ca(2+)-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca<sup>2+</sup> influx underlies potent induction of injury. *J Neurosci* 1996; 16(17): 5457–5465. PMID: 8757258.
7. Parsons M.P., Raymond L.A. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* 2014; 82(2): 279–293. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.03.030. PMID: 24742457.
8. Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T. et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta* 2014; 436: 332–347. DOI: 10.1016/j.cca.2014.06.004. PMID: 24933428.
9. Болдырев А.А. Карнозин: новые концепции для функций давно известной молекулы. *Биохимия* 2012; 77(4): 403–418. PMID: 22809149.
10. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev* 2013; 93(4): 1803–1845. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012. PMID: 24137022.
11. Dobrota D., Fedorova T., Stvolinsky S. et al. Carnosine protects the brain of rats and Mongolian gerbils against ischemic injury: after-stroke-effect. *Neurochem Res* 2005; 30(10): 1283–1288. DOI: 10.1007/s11064-005-8799-7. PMID: 16341589.
12. Boldyrev A.A., Stvolinsky S.L., Fedorova T.N., Suslina Z.A. Carnosine as a natural antioxidant and geroprotector: from molecular mechanisms to clinical trials. *Rejuvenation Res* 2010; 13(2–3): 156–158. DOI: 10.1089/rej.2009.0923. PMID: 20017611.
13. Park H.S., Han K.H., Shin J.A. et al. The neuroprotective effects of carnosine in early stage of focal ischemia rodent model. *J Korean Neurosurg Soc* 2014; 55(3): 125–130. DOI: 10.3340/jkns.2014.55.3.125. PMID: 24851146.
14. Bae O.N., Serfozo K., Baek S.H. et al. Safety and efficacy evaluation of carnosine, an endogenous neuroprotective agent for ischemic stroke. *Stroke* 2013; 44(1): 205–212. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.673954. PMID: 23250994.
15. Федорова Т.Н., Гаврилова С.А., Морозова М.П. и др. Нейропротекторное действие карнозина в условиях фокальной ишемии мозга. *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии* 2017; 20(4): 25–31.
16. Абаймов Д.А., Сариев А.К., Танкевич М.В. и др. Исследование базовых фармакокинетических характеристик и эффективности проникновения в ткань мозга дипептида карнозина в эксперименте. *Эксп. клин. фармакол.* 2015; 78(3): 30–5. PMID: 26036009.
17. Лопачев А.В., Лопачева О.М., Абаймов Д.А. и др. Нейропротекторное действие карнозина на первичную культуру клеток мозжечка крысы в условиях окислительного стресса. *Биохимия* 2016; 81(5): 678–689. PMID: 27297901.
18. Graham S.H., Chen J., Clark R.S. Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000; 17(10): 831–841. DOI: 10.1089/neu.2000.17.831. PMID: 11063051.
19. Broughton B.R., Reutens D.C., Sobey C.G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 2009; 40(5): e331–339. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.531632. PMID: 19182083.
20. Ferrer I., Planas A.M. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62(4): 329–339. PMID: 12722825.
21. Zhang L.M., Zhao X.C., Sun W.B. et al. Sevoflurane post-conditioning protects primary rat cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/resuscitation via down-regulation in mitochondrial apoptosis axis of Bid, Bim, Puma-Bax and Bak mediated by Erk1/2. *J Neurol Sci* 2015; 357(1–2): 80–87. DOI: 10.1016/j.jns.2015.06.070. PMID: 26152828.
22. Lu Q., Wang J., Jiang J. et al. rLj-RGD3, a Novel Recombinant Toxin Protein from *Lampetra japonica*, Protects against Cerebral Reperfusion Injury Following Middle Cerebral Artery Occlusion Involving the Integrin-PI3K/Akt Pathway in Rats. *PLoS One* 2016; 11(10): e0165093. DOI: 10.1371/journal.pone.0165093. PMID: 27768719.
23. Cheng C.Y., Tang N.Y., Kao S.T., Hsieh C.L. Ferulic Acid Administered at Various Time Points Protects against Cerebral Infarction by Activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/Bcl-2 Anti-Apoptotic Signaling in the Subacute Phase of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *PLoS One* 2016; 11(5): e0155748. DOI: 10.1371/journal.pone.0155748. PMID: 27187745.

## References

1. Piradov M.A., Tanashyan M.M., Domashenko M.A. et al. [Neuroprotection in cerebrovascular diseases: is it the search for life on Mars or a promising trend of treatment? Part 1. Acute stroke]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2015; 9(1): 41–50. (in Russ.)
2. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381): 1309–1312. PMID: 9721092.
3. Niizuma K., Endo H., Chan P.H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem* 2009; 109 Suppl 1: 133–138. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.05897.x. PMID: 19393019.
4. Atlante A., Calissano P., Bobba A. et al. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* 2001; 497(1): 1–5. PMID: 11376653.
5. Babot Z., Cristofol R., Sunol C. Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABA<sub>A</sub> receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci* 2005; 21(1): 103–112. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03848.x. PMID: 15654847.
6. Lu Y.M., Yin H.Z., Chiang J., Weiss J.H. Ca(2+)-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca<sup>2+</sup> influx underlies potent induction of injury. *J Neurosci* 1996; 16(17): 5457–5465. PMID: 8757258.
7. Parsons M.P., Raymond L.A. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* 2014; 82(2): 279–293. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.03.030. PMID: 24742457.
8. Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T. et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta* 2014; 436: 332–347. DOI: 10.1016/j.cca.2014.06.004. PMID: 24933428.
9. Boldyrev A.A. Carnosine: new concept for the function of an old molecule. *Biochemistry (Mosc)* 2012; 77(4): 313–326. DOI: 10.1134/S0006297912040013. PMID: 22809149.
10. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev* 2013; 93(4): 1803–1845. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012. PMID: 24137022.
11. Dobrota D., Fedorova T., Stvolinsky S. et al. Carnosine protects the brain of rats and Mongolian gerbils against ischemic injury: after-stroke-effect. *Neurochem Res* 2005; 30(10): 1283–1288. DOI: 10.1007/s11064-005-8799-7. PMID: 16341589.
12. Boldyrev A.A., Stvolinsky S.L., Fedorova T.N., Suslina Z.A. Carnosine as a natural antioxidant and geroprotector: from molecular mechanisms to clinical trials. *Rejuvenation Res* 2010; 13(2–3): 156–158. DOI: 10.1089/rej.2009.0923. PMID: 20017611.
13. Park H.S., Han K.H., Shin J.A. et al. The neuroprotective effects of carnosine in early stage of focal ischemia rodent model. *J Korean Neurosurg Soc* 2014; 55(3): 125–130. DOI: 10.3340/jkns.2014.55.3.125. PMID: 24851146.
14. Bae O.N., Serfozo K., Baek S.H. et al. Safety and efficacy evaluation of carnosine, an endogenous neuroprotective agent for ischemic stroke. *Stroke* 2013; 44(1): 205–212. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.673954. PMID: 23250994.
15. Fedorova T.N., Gavrilova S.A., Morozova M.P. et al. [The neuroprotective effect of the carnosine in a focal cerebral ischemia]. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii* 2017; 20(4): 25–31. (in Russ.)
16. Sariev A.K., Abaimov D.A., Tankevich M.V. et al. [Experimental study of the basic pharmacokinetic characteristics of dipeptide carnosine and its efficiency of penetration into brain tissues]. *Eksp Klin Farmakol* 2015; 78(3): 30–35. PMID: 26036009. (in Russ.)
17. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Abaimov D.A. et al. Neuroprotective Effect of Carnosine on Primary Culture of Rat Cerebellar Cells under Oxidative Stress. *Biochemistry (Mosc)* 2016; 81(5): 511–520. DOI: 10.1134/S0006297916050084. PMID: 27297901.
18. Graham S.H., Chen J., Clark R.S. Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000; 17(10): 831–841. DOI: 10.1089/neu.2000.17.831. PMID: 11063051.
19. Broughton B.R., Reutens D.C., Sobey C.G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 2009; 40(5): e331–339. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.531632. PMID: 19182083.
20. Ferrer I., Planas A.M. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62(4): 329–339. PMID: 12722825.
21. Zhang L.M., Zhao X.C., Sun W.B. et al. Sevoflurane post-conditioning protects primary rat cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/resuscitation via down-regulation in mitochondrial apoptosis axis of Bid, Bim, Puma-Bax and Bak mediated by Erk1/2. *J Neurol Sci* 2015; 357(1–2): 80–87. DOI: 10.1016/j.jns.2015.06.070. PMID: 26152828.
22. Lu Q., Wang J., Jiang J. et al. rLj-RGD3, a Novel Recombinant Toxin Protein from *Lampetra japonica*, Protects against Cerebral Reperfusion Injury Following Middle Cerebral Artery Occlusion Involving the Integrin-PI3K/Akt Pathway in Rats. *PLoS One* 2016; 11(10): e0165093. DOI: 10.1371/journal.pone.0165093. PMID: 27768719.
23. Cheng C.Y., Tang N.Y., Kao S.T., Hsieh C.L. Ferulic Acid Administered at Various Time Points Protects against Cerebral Infarction by Activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/Bcl-2 Anti-Apoptotic Signaling in the Subacute Phase of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *PLoS One* 2016; 11(5): e0155748. DOI: 10.1371/journal.pone.0155748. PMID: 27187745.

24. Bright R., Raval A.P., Dembner J.M. et al. Protein kinase C delta mediates cerebral reperfusion injury in vivo. *J Neurosci* 2004; 24(31): 6880–6888. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4474-03.2004. PMID: 15295022.
25. Niizuma K., Yoshioka H., Chen H. et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802(1): 92–99. DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.09.002. PMID: 19751828.
26. Chen H., Yoshioka H., Kim G.S. et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(8): 1505–1517. DOI: 10.1089/ars.2010.3576. PMID: 20812869.
27. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. (ред.). Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М.: Профиль, 2010.
28. Chen S.T., Hsu C.Y., Hogan E.L. et al. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 1986; 17(4): 738–743. PMID: 2943059.
29. Гаврилова С.А., Самойленкова Н.С., Пирогов Ю.А. и др. Нейропротекторный эффект гипоксического preconditionирования при фокальной ишемии мозга крыс. *Патогенез* 2008; 6(3): 13–17.
30. Wang J.P., Yang Z.T., Liu C. et al. L-carnosine inhibits neuronal cell apoptosis through signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway after acute focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2013; 1507: 125–133. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.02.032. PMID: 23454231.
31. Cheng J., Wang F., Yu D.F. et al. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAKP pathway in neurons. *Eur J Pharmacol* 2011; 650(1): 184–194. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.09.033. PMID: 20868662.
32. Minami M., Jin K.L., Li W. et al. Bcl-w expression is increased in brain regions affected by focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 2000; 279(3): 193–195. PMID: 10688062.
33. Ouyang Y.B., Giffard R.G. Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function. *Cell Calcium* 2004; 36(3–4): 303–311. DOI: 10.1016/j.ceca.2004.02.015. PMID: 15261486.
34. Mattson M.P., Culmsee C., Yu Z.F. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 2000; 301(1): 173–187. PMID: 10928290.
35. Yaidikar L., Thakur S. Punicalagin attenuated cerebral ischemia-reperfusion insult via inhibition of proinflammatory cytokines, up-regulation of Bcl-2, down-regulation of Bax, and caspase-3. *Mol Cell Biochem* 2015; 402(1–2): 141–148. DOI: 10.1007/s11010-014-2321-y. PMID: 25555468.
36. Moore J.G., Hibbard L.T., Growdon W.A., Schiffrin B.S. Urinary tract endometriosis: enigmas in diagnosis and management. *Trans Pac Coast Obstet Gynecol Soc* 1979; 46: 61–71. PMID: 542976.
37. Xie R., Wang P., Ji X., Zhao H. Ischemic post-conditioning facilitates brain recovery after stroke by promoting Akt/mTOR activity in nude rats. *J Neurochem* 2013; 127(5): 723–732. DOI: 10.1111/jnc.12342. PMID: 23777415.
38. Zhu X., Castellani R.J., Takeda A. et al. Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev* 2001; 123(1): 39–46. PMID: 11640950.
39. Zamora-Martinez E.R., Edwards S. Neuronal extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity as marker and mediator of alcohol and opioid dependence. *Front Integr Neurosci* 2014; 8: 24. DOI: 10.3389/fnint.2014.00024. PMID: 24653683.
40. Ha S., Redmond L. ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling. *Dev Neurobiol* 2008; 68(14): 1565–1579. DOI: 10.1002/dneu.20682. PMID: 18837011.
41. Luo T., Wu W.H., Chen B.S. NMDA receptor signaling: death or survival? *Front Biol (Beijing)* 2011; 6(6): 468–476. DOI: 10.1007/s11515-011-1187-6. PMID: 23144645.
42. Morrison R.S., Kinoshita Y., Johnson M.D. et al. Neuronal survival and cell death signaling pathways. *Adv Exp Med Biol* 2002; 513: 41–86. PMID: 12575817.
43. Cheung E.C., Slack R.S. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE* 2004; 2004(251): PE45. DOI: 10.1126/stke.2512004pe45. PMID: 15383672.
44. Okami N., Narasimhan P., Yoshioka H. et al. Prevention of JNK phosphorylation as a mechanism for rosiglitazone in neuroprotection after transient cerebral ischemia: activation of dual specificity phosphatase. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33(1): 106–114. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.138. PMID: 23032483.
24. Bright R., Raval A.P., Dembner J.M. et al. Protein kinase C delta mediates cerebral reperfusion injury in vivo. *J Neurosci* 2004; 24(31): 6880–6888. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4474-03.2004. PMID: 15295022.
25. Niizuma K., Yoshioka H., Chen H. et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802(1): 92–99. DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.09.002. PMID: 19751828.
26. Chen H., Yoshioka H., Kim G.S. et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(8): 1505–1517. DOI: 10.1089/ars.2010.3576. PMID: 20812869.
27. Karkishchenko N.N., Grachev S.V. (ed.). Rukovodstvo po laboratornym zhi-votnym i alternativnym modelyam v biomedicinskih tekhnologiyah. [Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technology] Moscow. Profile, 2010. (in Russ.)
28. Chen S.T., Hsu C.Y., Hogan E.L. et al. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 1986; 17(4): 738–743. PMID: 2943059.
29. Gavrilova S.A., Samoylenkova N.S., Pirogov Yu.A. et al. [Neuroprotective effect of hypoxic preconditioning in focal ischemia of rat brain]. *Patogenez* 2008; 6(3): 13–17. (in Russ.)
30. Wang J.P., Yang Z.T., Liu C. et al. L-carnosine inhibits neuronal cell apoptosis through signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway after acute focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2013; 1507: 125–133. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.02.032. PMID: 23454231.
31. Cheng J., Wang F., Yu D.F. et al. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAKP pathway in neurons. *Eur J Pharmacol* 2011; 650(1): 184–194. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.09.033. PMID: 20868662.
32. Minami M., Jin K.L., Li W. et al. Bcl-w expression is increased in brain regions affected by focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 2000; 279(3): 193–195. PMID: 10688062.
33. Ouyang Y.B., Giffard R.G. Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function. *Cell Calcium* 2004; 36(3–4): 303–311. DOI: 10.1016/j.ceca.2004.02.015. PMID: 15261486.
34. Mattson M.P., Culmsee C., Yu Z.F. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 2000; 301(1): 173–187. PMID: 10928290.
35. Yaidikar L., Thakur S. Punicalagin attenuated cerebral ischemia-reperfusion insult via inhibition of proinflammatory cytokines, up-regulation of Bcl-2, down-regulation of Bax, and caspase-3. *Mol Cell Biochem* 2015; 402(1–2): 141–148. DOI: 10.1007/s11010-014-2321-y. PMID: 25555468.
36. Moore J.G., Hibbard L.T., Growdon W.A., Schiffrin B.S. Urinary tract endometriosis: enigmas in diagnosis and management. *Trans Pac Coast Obstet Gynecol Soc* 1979; 46: 61–71. PMID: 542976.
37. Xie R., Wang P., Ji X., Zhao H. Ischemic post-conditioning facilitates brain recovery after stroke by promoting Akt/mTOR activity in nude rats. *J Neurochem* 2013; 127(5): 723–732. DOI: 10.1111/jnc.12342. PMID: 23777415.
38. Zhu X., Castellani R.J., Takeda A. et al. Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev* 2001; 123(1): 39–46. PMID: 11640950.
39. Zamora-Martinez E.R., Edwards S. Neuronal extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity as marker and mediator of alcohol and opioid dependence. *Front Integr Neurosci* 2014; 8: 24. DOI: 10.3389/fnint.2014.00024. PMID: 24653683.
40. Ha S., Redmond L. ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling. *Dev Neurobiol* 2008; 68(14): 1565–1579. DOI: 10.1002/dneu.20682. PMID: 18837011.
41. Luo T., Wu W.H., Chen B.S. NMDA receptor signaling: death or survival? *Front Biol (Beijing)* 2011; 6(6): 468–476. DOI: 10.1007/s11515-011-1187-6. PMID: 23144645.
42. Morrison R.S., Kinoshita Y., Johnson M.D. et al. Neuronal survival and cell death signaling pathways. *Adv Exp Med Biol* 2002; 513: 41–86. PMID: 12575817.
43. Cheung E.C., Slack R.S. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE* 2004; 2004(251): PE45. DOI: 10.1126/stke.2512004pe45. PMID: 15383672.
44. Okami N., Narasimhan P., Yoshioka H. et al. Prevention of JNK phosphorylation as a mechanism for rosiglitazone in neuroprotection after transient cerebral ischemia: activation of dual specificity phosphatase. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33(1): 106–114. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.138. PMID: 23032483.

**Информация об авторах:** Лопачева Ольга Михайловна – лаборант-исследователь лаб. клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ НЦН. 125367, Россия, Москва, Волоколамское ш., д.80. E-mail: olga3511@yandex.ru;  
Лопачев А.В. – м.н.с., лаб. клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;  
Куличенкова К.Н. – асп. лаб. клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;  
Девятков А.А. – лаборант-исследователь лаб. клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;  
Бережной Д.С. – к.б.н., н.с., лаб. клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;  
Стволинский С.Л. – д.б.н.; в.н.с., лаб. клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;  
Куликова О.И. – м.н.с., лаб. клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;  
Гаврилова С.А. – к.б.н., доцент каф. физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;  
Морозова М.П. – к.б.н., ассистент каф. физиологии и общей патологии, ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;  
Федорова Т.Н. – д.б.н., зав. лаб. клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия

**Information about the authors:** Olga M. Lopacheva, technician, Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Research Center of Neurology. 125367, Moscow, Russia, Volokolamskoe shosse, 80. E-mail: olga3511@yandex.ru;  
Alexander V. Lopachev, junior researcher, Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Research Center of Neurology, Moscow, Russia;  
Kseniya N. Kulichenkova, PhD-student, Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Research Center of Neurology, Moscow, Russia  
Alexander A. Devyatov, technician, Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Research Center of Neurology, Moscow, Russia  
Daniil S. Berezhnoy, PhD, researcher, Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Research Center of Neurology, Moscow, Russia  
Sergey L. Stvolinsky, Dr. Sci. (Biol.), leading researcher of the Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Research Center of Neurology, Moscow, Russia  
Olga I. Kulikova, technician, Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Research Center of Neurology, Moscow, Russia  
Svetlana A. Gavrilova, PhD, associate professor of the Department of Physiology and General Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
Mariya P. Morozova, PhD, teaching assistant of the Department of Physiology and General Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
Tatiana N. Fedorova, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Research Center of Neurology, Moscow, Russia