

Н. И. Мезен¹, Э. К. Сидорович², З. Б. Квачева³,
А. Г. Полешко³, С. В. Пинчук³

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ СОЧЕТАНИЙ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ АСТРОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ И РЕОКСИГЕНАЦИИ, МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА (Сообщение 1)

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
ГУ «РНПЦ неврологии и нейрохирургии»²,
ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»³

В статье представлено описание разработанных моделей стрессовых воздействий на астроглиальные клетки в культуре, имеющие место при ишемических повреждениях мозга и изучен протективный эффект некоторых лекарственных препаратов и их сочетаний (гроприносина, симвастина (статины), цефтриаксона). Астроциты являются главной мишенью изучения при моделировании условий гипоксии и разработке новых подходов к нейропротекции. Реализация такого подхода на практике обозначает необходимость подбора не одного или двух нейропротективных препаратов, а целой схемы нейропротективного лечения, то есть подбор комбинации препаратов с разнонаправленным протективным действием, что позволит совершить прорыв в изучении проблемы нейропротекции при инсультах и др. патологиях.

Ключевые слова: гипоксия, астроциты, культура клеток, инсульт, гроприносин, симвастин, цефтриаксон.

**N. I. Mezen, E. K. Sidorovich, Z. B. Kvacheva,
A. G. Poleschko, S. W. Pinchuk**

STUDY OF THE PROTECTIVE EFFECT OF MEDICAL PREPARATIONS AND THEIR COMBINATIONS ON STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF ASTROGLIAL CELLS CULTIVATED UNDER THE INFLUENCE OF HYPOXIA, REOXIGENATION, AND METABOLIC STRESS

The article represents the developed models of stress impact on astroglial cells in culture, in case of cerebral ischemic impairments. The protective effect of certain medical preparations and their compounds (groprinasin, simvastatin, ceftriaxon) on astroglial cells cultivated in various stress situations were studied. It is now astrocytes that are the main target of the study in modeling conditions of hypoxia and the development of new approaches to antihypoxic preparations in vitro.

In practice the implementation of this approach indicates the necessity of selection is not one or two neuroprotective treatment, ie the selection of preparation combination with multi-directional protective effect. In the opinion of many authors it will allow study the problems of neuroprotection in treating strokes and other pathologic conditions.

Key words: hypoxia, astrocytes, culture cells, stroke, groprinasin, simvastatin, ceftriaxon.

Лечение пациентов в реабилитационном периоде ишемии мозга ориентировано на защиту нейронов, поэтому широко разрабатываются и внедряются нейропротекторные лекарственные средства. Культуры глиии широко используются для моделирования различных патологических процессов на молекулярном уровне клеточных популяций (гипоксическое повреждение, окислительный стресс, вирусные инфекции и др.), так

и для скрининга различных протективных препаратов и их комбинаций [5]. Используемые в настоящее время нейропротекторные препараты имеют разные свойства: противовоспалительное, иммуномодулирующее, снижающее уровень холестерина [1, 6, 7]. Ещё не менее важное их свойство – это способность прохождения через гематоэнцефалический барьер. В связи с этим, важным является изучение их влияния на функционирование и свойства

нейронов и глии в норме и патологии. Данные об эффектах статинов на клетки ЦНС противоречивы и требуют дальнейших исследований в этом направлении. Показано, что в определённых дозах статины снижают активность глутаматных рецепторов, предохраняя их от экзотоксического инсульта. В высоких дозах они могут играть роль ингибитора роста и индуцировать нейрональный апоптоз [1]. Неизвестен их сочетанный эффект с иммуномоделирующими препаратами (гроприносин) антибиотиками на подвергнутые гипоксии нейроглиальные клетки [6–8].

Целью данной работы явилось: разработка схемы нейропротекторного действия на основе различных лекарственных препаратов и их сочетаний (гроприносина, симвастина (статина), цефтриаксона) путем отбора критериев оценки восстановления структурно функциональных свойств астроцитов в условиях воздействия гипоксии и метаболического стресса.

Материалы и методы

Приготовление культур клеток мозга крысы проводилось как описано ранее [2, 3, 5]. Приготовление стоковых растворов и разведений препаратов:

500 мг препарата *гроприносин* (Гр): (таблетка) растворяли в 50 мл среды DMEM/F-12 (1:1) до концентрации 10 000 мкг/мл (стоковый раствор), из которого готовили дальнейшие разведения. Исследовали влияние на культуры клеток мозга крысы концентраций: 80 мкг/мл (Г7), 40 мкг/мл (Г6), 250 мкг/мл (Г5), 125 мкг/мл (Г4), 63 мкг/мл (Г3);

20 мг препарата *симвастин* (С), (таблетка) растворяли в 20 мл среды DMEM/F-12 (1:1) до концентрации 1000 мкг/мл (стоковый раствор). Далее проводили последовательные разведения стокового раствора (10^0) в 10 раз до 10^{-6} и 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , что соответствовало 4-ем исследуемым концентрациям препарата 0,001 мкг = 1 нг/мл (C^6); 0,1 нг/мл (C^7); 0,01 нг/мл (C^8); 0,001 нг/мл (C^9);

1 г препарата *цефтриаксон* (Ц), (порошок) растворяли в 100 мл среды DMEM/F-12 (1:1) до концентрации 10 000 мкг/мл (стоковый раствор). Исследовали действие концентрации) – 1–0,001 нг/мл, (разведение в 200 раз).

Внесение препаратов симвастина, гроприносина и цефтриаксона в культуры клеток мозга крысы. Культуры клеток мозга крысы 5-ого пассажа для последующего измерения антиоксидантного статуса и вязкости мембранных липидов культивировали на 24-луночных планшетах или на стеклах в пенфлаконах для последующей фиксации и оценки морфологии культивировали в среде DMEM с 10 % FBS на протяжении 3 суток. Затем проводили смену среды на DMEM (1:1) с 2 % FBS (контрольные лунки) либо на DMEM с 2 % FBS и различными концентрациями и сочетаниями 3-х препаратов. Учет результатов проводили через 18 часа культивирования после внесения препаратов в условиях нормоксии и гипоксии.

Моделирование условий гипоксии: культуры клеток мозга крысы 2–5-го пассажей культивировали в среде DMEM/F-12 (1:1) с 10 % FBS на протяжении 3 суток в CO_2 -инкубаторе при +37 °C и 95 % влажности (условия нормоксии) до достижения конfluence монослоя, затем культуры переносили в гипоксическую камеру с газовой смесью: 98 % азота и 2 % кислорода или 12 % кислорода, подающейся в камеру с помощью смесителя-дозатора газов при +37 °C, на 18–24 часов. Оценку гипоксического воздействия на культуры нейроглиальных

клеток по исследуемым показателям проводили, извлекая их из гипоксической камеры и перенося на 90 мин в обычный термостат при 37 °C для создания условий реоксигенации. Контролем служили культуры астроцитов, которые инкубировали в течение соответствующего периода времени в условиях нормы CO_2 инкубатор, 37 °C [3, 5].

Пробоподготовка культур клеток мозга крысы для определения антиоксидантного статуса и состояния мембран клеток: клетки монослоя отделяли от культуральной поверхности раствором 0,125 % трипсина в 0,02 % ЭДТА, отмывали от остатков среды и протеолитических ферментов. При определении антиоксидантного статуса доводили концентрацию клеток до 150–200 тыс./мл среды, исследовали 0,5–1 мл суспензии клеток в среде DMEM либо в фосфатном буфере. **Определение внутриклеточного уровня H_2O_2 и NO:** определение внутриклеточного уровня перекисей проводили с использованием флуоресцентного зонда CM-H2-DCF-DA (5-(-6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат) (Invitrogen). Определение внутриклеточного уровня перекисей проводили с использованием флуоресцентного зонда DAF-FM-DA (4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуоресцеин диацетат) (Sigma). Для этого в 400 мкл суспензии клеток мозга крысы (100–200 тыс. кл/мл) добавляли зонд до конечной концентрации 5 мкМ и инкубировали 30 мин при 37 °C. После завершения периода инкубации клетки отмывали 2 раза в PBS, ресуспендировали в среде DMEM/F-12 и помещали в термостат (37 °C) на 2 ч. Измерение проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II. Непосредственно перед измерением к образцам добавляли пропидиум иодид (2 мкг/мл), свечение которого регистрируется в соответствующем канале, что позволяет проводить параллельную его регистрацию с CM-H2-DCF-DA или DAF-FM-DA. На данном этапе выбирали гейт жизнеспособных клеток, в котором далее анализируется содержание перекисей (пик справа отображает клетки с нарушенной целостностью мембраны, что позволяет проникать в них PI. **Определение вязкости мембранных липидов:** вязкость липидного бислоя плазматической мембраны клеток оценивали по степени поляризации флуоресценции зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГТ). Для встраивания зонда в липидный бислой суспензию клеток ($2 \cdot 10^5$ – $3 \cdot 10^5$ кл/мл) в PBS инкубировали в темноте в присутствии ДФГТ (1 мкМ) в течение 45–60 мин при 37 °C. Флуоресценцию зонда регистрировали при 430 нм ($\lambda_{возб} = 362$ нм). Степень поляризации (P) флуоресценции ДФГТ рассчитывали по формуле: $P = (I_{\parallel} - G I_{\perp}) / (I_{\parallel} + G I_{\perp})$, где I_{\parallel} – интенсивность флуоресценции ДФГТ когда поляризатор на возбуждение ориентирован параллельно поляризатору на регистрацию, I_{\perp} – интенсивность флуоресценции ДФГТ когда поляризатор на возбуждение ориентирован перпендикулярно поляризатору на регистрацию, G – фактор, отражающий различную чувствительность прибора для вертикально и горизонтально поляризованного света. **Определение потенциала плазматической мембраны:** оценку изменения потенциала плазматической мембраны клеток проводили с использованием потенциал-чувствительного зонда мероцианина 540 (Mц540). К 0,5 мл 10^5 клеток в DMEM/F-12 добавляли 1,0 мкМ Mц540 и инкубировали в темноте при 37 °C в течение 5 мин. Измеряли интенсивность флуоресценции Mц540 в отдельных клетках на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) в канале PE (585/30 нм) при возбуждении 488 нм.

Методы статистической обработки результатов

При обработке экспериментальных данных вычисляли среднеарифметические величины, их доверительные интервалы и проводили оценку достоверности различий с помощью непараметрических критериев. На одну точку исследования брали не менее 3-х флаконов с культурами [4].

Результаты и обсуждение

На основании полученных результатов, представленных в таблице 1, можно сделать вывод, что все исследуемые концентрации препаратов и их сочетаний не вызывают статистически значимого влияния на содержание в культурах жизнеспособных, апоптотических и некротических клеток в условиях нормоксии. Также не отмечено достоверного влияния на вязкость мембранных липидов клеток ($P < 0,5$). Внутриклеточное содержание супероксид анион радикала при внесении только сивмастатина, гроприносоина или цефтриаксона не изменялось по отношению к контролю. Но сочетание гроприносоина с сивмастатином (все 4 исследуемые варианта, №№8–11) приводило к небольшому снижению содержания радикала. Отмеченная тенденция может свидетельствовать о том, что при низком содержании сыворотки в среде культивирования (2 %), а это является стрессовым фактором для культур, сочетанное внесение гроприносоина и сивмастатина оказывает протекторное влияние на клетки

мозга крысы, повышая их антиоксидантный статус. Следует отметить, что показатели жизнеспособности клеток после проведенной пробоподготовки (через 2 часа после перевода клеток из монослоя в суспензию) падали незначительно во всех исследуемых образцах, на 1–6 %.

При ранее подобранных условиях гипоксического воздействия (18 часов инкубации клеток в условиях гипоксии) было исследовано влияние различных концентраций препаратов и их сочетаний на антиоксидантный статус и вязкость мембранных липидов клеток мозга крысы в условиях метаболического стресса.

При снижении сыворотки в питательной среде до 2 % и гипоксического воздействия (18 часов) получены следующие результаты, которые представлены в таблице 2.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, в культурах астроцитов инкубируемых в условиях гипоксии (18 час.) и последующей реоксигенации в течение 90 мин, при снижении содержания сыворотки в питательной среде до 2 %, увеличивается в среднем в 2 раза количество некротических и апоптотических клеток ($P < 0,05$), однако полной деструкции клеток не наступает. Также отмечается увеличение в этих условиях внутриклеточного содержания супероксид анионов. Это свидетельствует о том, что выбранное время инкубации культур в условиях гипоксии оптимально для изучения различных факторов, так как в эти сроки (18–20 часов) не происходит гибели культур, но запускаются внутриклеточные процессы,

Таблица 1. Характеристика структурно-функциональных свойств культивируемых астроглиальных клеток в присутствии различных концентраций препаратов и их сочетаний в условиях нормоксии (сод. сыворотки 2 % в пит. среде)

		% жизнеспособных	% некротических	% апоптотических	Коэффициент мероцианина (вязкость)	супер-оксид анион радикал	Жизнеспособность после манипуляций, разница
1	контроль	94,3 ± 1,5	2,3 ± 0,03	3,4 ± 0,01	137,5 ± 2,0	1,82 ± 0,01	2,6 ± 0,05
2	C ⁶	94,0 ± 1,3	2,2 ± 0,01	3,8 ± 0,03	122 ± 1,5	2,26 ± 0,01	3,7 ± 0,04
3	C ⁷	95 ± 1,8	1,8 ± 0,02	3,2 ± 0,01	124,5 ± 1,8	2,56 ± 0,03	3,5 ± 0,03
4	Г6	94,5 ± 1,4	1,9 ± 0,01	4,6 ± 0,02	150 ± 2,3	2,27 ± 0,07	4,2 ± 0,04
5	Г7	93,7 ± 1,5	1,8 ± 0,01	3,5 ± 0,02	125 ± 2,0	2,09 ± 0,04	5 ± 0,03
6	Ц50	93,8 ± 0,5	1,8 ± 0,02	4,4 ± 0,05	156 ± 1,2	1,96 ± 0,04	1,1 ± 0,04
7	Ц50+ C ⁷	96 ± 1,3	1,6 ± 0,02	2,4 ± 0,02	144 ± 1,3	2,01 ± 0,01	3 ± 0,07
8	Гр6+ C ⁶	96 ± 1,3	1,6 ± 0,03	2,4 ± 0,02	136 ± 1,8	1,25 ± 0,01	4,5 ± 0,04
9	Гр6+ C ⁷	96 ± 1,5	1,8 ± 0,01	2,7 ± 0,02	127 ± 3,0	1,05 ± 0,03	5 ± 0,05
10	Гр7+ C ⁶	94,2 ± 0,6	2,3 ± 0,03	3,5 ± 0,04	131 ± 2,0	1,56 ± 0,02	4,5 ± 0,02
11	Гр7+ C ⁷	94,8 ±	1,4 ± 0,01	3,8 ± 0,04	134 ± 1,2	1,67 ± 0,01	5,1 ± 0,01

Таблица 2. Характеристика структурно-функциональных свойств культивируемых астроглиальных клеток в присутствии различных концентраций препаратов и их сочетаний в условиях гипоксии (содержание сыворотки 2 % в пит. среде)

		% жизнеспособных	% некротических	% апоптотических	Коэффициент мероцианина (вязкость)	Супер-оксид анион радикал	Жизнеспособность после манипуляций, разница %
1	контроль	90,5 ± 2,0	2,6 ± 0,04	6,9 ± 0,07	108,7 ± 2,3	3,94 ± 0,07	25,5 ± 0,5
2	C ⁶	91 ± 1,3	20,03,7 ± 0,06	6,3 ± 0,05	126,5 ± 1,8	4,76 ± 0,05	31,0 ± 0,3
3	C ⁷	92 ± 1,0	2,7 ± 0,03	5,3 ± 0,05	123,0 ± 1,7	2,86 ± 0,03	15,5 ± 0,5
4	Гр6	91,5 ± 1,4	2,3 ± 0,05	6,2 ± 0,08	109 ± 1,2	3,38 ± 0,04	29,0 ± 0,2
5	Гр7	91,1 ± 1,0	2,0 ± 0,05	6,9 ± 0,03	121,5 ± 1,3	4,0 ± 0,05	22,0 ± 0,15
6	Ц50	92 ± 0,8	3,1 ± 0,07	4,9 ± 0,03	128,5 ± 1,0	2,85 ± 0,05	15,6 ± 3
7	Ц50+ C ⁷	92,2 ± 0,1	2,4 ± 0,04	5,4 ± 0,07	115 ± 1,5	3,1 ± 0,04	22,5 ± 0,18
8	Гр6+ C ⁶	92,5 ± 1,2	3,0 ± 0,03	4,5 ± 0,02	116 ± 1,2	3,48 ± 0,03	24,4 ± 0,1
9	Гр6+ C ⁷	90,5 ± 1,3	3,1 ± 0,04	6,4 ± 0,05	117 ± 1,0	3,32 ± 0,02	27,5 ± 0,2
10	Гр7+ C ⁶	91 ± 1,0	2,3 ± 0,06	6,7 ± 0,05	110 ± 1,6	2,35 ± 0,01	26,3 ± 0,15
11	Гр7+ C ⁷	90,1 ± 1,0	2,7 ± 0,03	7,2 ± 0,03	112 ± 1,2	2,27 ± 0,02	26,0 ± 0,1

которые свидетельствуют о повреждающем эффекте недостатка кислорода: увеличивается содержание АФК, снижается жизнеспособность клеток. Также, следует отметить, что гипоксия снижает устойчивость клеток к стрессовым факторам внешней среды (реоксигенация) по сравнению с культурами, выращенными в условиях нормоксии. Так, после гипоксического воздействия и проведения прободготовки резко снижается количество жизнеспособных клеток (на 15–35 %). Все исследуемые концентрации препаратов и их сочетания не вызывают статистически значимого влияния на содержание в культурах жизнеспособных, апоптотических и некротических клеток в условиях гипоксии (18 часов), а затем реоксигенации (90 мин) при содержании сыворотки в питательной среде 2 %. Однако следует отметить, что сочетанное действие гроприносина в дозе 80 мкг/мл с обеими концентрациями симвастина, в выше описанных условиях, препятствуют накоплению АФК в клетках на 40,4 % и 42,2 % по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Это может свидетельствовать о запуске данными сочетаниями препаратов защитных механизмов в клетках в ответ на повреждающие условия (гипоксия, снижение содержания сыворотки в питательной среде). Некоторая тенденция к снижению супероксид анионов отмечена и при сочетании симвастина с меньшей концентрацией гроприносина – 40 мкг/мл. Более выраженное протекторное действие данных лекарственных препаратов на жизнеспособность астроцитов проявлялось при инкубации клеток в условиях метаболического стресса, индуцированного переводом клеток в питательную среду без сыворотки. Инкубация астроглиальных клеток в бессывороточной среде в течение 90 мин при 37°C приводила к гибели клеток. Так, инкубация в такой среде астроглиальных клеток, культивированных в условиях нормоксии, приводила к гибели 39 % клеток, культивированных в условиях гипоксии количество жизнеспособных клеток снижалось на 32 %. Препараты гроприносин в дозе 63 мкг/мл и статинов в дозе 0,001 мкг/мл и их сочетание увеличивали устойчивость клеток к стрессовому воздействию: снижение количества жизнеспособных клеток в этих условиях составляло 26 %, 28 % и 20 %, соответственно. Препарат цефтриаксон напротив значительно увеличивал гибель клеток в условиях метаболического стресса: количество жизнеспособных клеток снижалось на 45 %, при этом цефтриаксон и статины в выше указанных дозах оказывали некоторое защитное действие, снижая гибель клеток до 40 %.

В основе наблюдаемых эффектов влияния условий культивирования и препаратов на жизнеспособность астроцитов, вероятно, лежит изменение антиоксидантного статуса клеток. Литературные данные свидетельствуют о том, что в условиях метаболического стресса в клетках значительно интенсифицируются окислительные повреждения [7, 8]. В астроцитах, культивированных в условиях гипоксии в присутствии гроприносина и статина внутриклеточное содержание радикалов было ниже по сравнению с условиями нормоксии. Это позволило предположить о более высоком уровне антиоксидантной защиты в таких клетках. Следовательно, большая устойчивость нейроглиальных клеток, культивированных в условиях гипоксии в присутствии гроприносина и статина, вероятнее всего, обусловлена более эффективной их защитой от окислительных повреждений, чем при условиях метаболического стресса. Препарат цефтриаксон

оказывал противоположное влияние на антиоксидантную систему нейроглиальных клеток в условиях гипоксии: количество радикалов в клетках увеличивалось и, следовательно, антиоксидантная защита снижалась. Эти же клетки, культивируемые с препаратом цефтриаксон, проявляли меньшую устойчивость к стрессовому воздействию.

На основании этих данных временной интервал воздействия гипоксии 18–20 часов был выбран для оценки следующих функциональных показателей: мембранный потенциал митохондрий, вязкость цитоплазматической мембраны, внутриклеточное содержание активных форм кислорода (АФК), так как в эти сроки повреждающее влияние условий гипоксии на клетки не является необратимым и имеется возможность оценивать интенсивность защитных механизмов клеток.

Выводы

1. Разработана модель гипоксического повреждения астроцитов в культуре клеток, которая позволяет проводить изучение протективного действия препаратов, используемых для лечения нейродегенеративных патологий.

2. В условиях гипоксии в культивируемых при 37 °С астроглиальных клетках в питательной среде с содержанием сыворотки 2 % и реоксигенации в течение 90 мин, увеличивается в среднем в 2 раза число некротических и апоптотических клеток. Также отмечается увеличение внутриклеточного содержания супероксид аниона.

3. Установлено сочетанное протекторное действие препаратов гроприносина в дозах 80–40 мкг/мл и статина – 1–0,001 нг/мл, при инкубации их с клетками в условиях гипоксии и метаболического стресса, что проявляется в увеличении устойчивости клеток к стрессовому воздействию.

4. Отмечена тенденция к снижению внутриклеточного содержания АФК после сочетанного внесения гроприносина и симвастина. Они оказывают протекторное влияние на культивируемые клетки мозга крысы, повышая их антиоксидантный статус в условиях нормоксии, а после гипоксического воздействия данный эффект более выражен при использовании гроприносина в концентрации 80–63 мкг/мл с симвастином в диапазоне концентраций 1–0,001.

5. Цефтриаксон – в дозе 50 мкг/мл, не оказал протекторного действия на клетки в условиях гипоксии.

Литература

1. Аронов, Д. М. Плейотропные эффекты статинов // Русский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9, № 13. – С. 2–7.
2. Квачева, З. Б., Недзьведь М. К., Рытик П. Г. и др. Длительное культивирование клеток мозга человека и их морфологическое изучение // Материалы I Всесоюзного симпозиума «Возбудимые клетки в культуре ткани». – Пушкино, 1984. – С. 108–111.
3. Мезен, Н. И., Квачева З. Б., Федулов А. С., Олешкевич Ф. В., Шадыро О. И., Тимошук В. А. Влияние гипоксии на морфофункциональные параметры астроцитов в монослойной культуре // Бюл. Экспер. Биологии и медицины. – 1996. – № 11, т. 122. – С. 581–584.
4. Полтавцева, Р. А., Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1967. – 322 с.
5. Федулов, А. С., Мезен Н. И., Квачева З. Б., Илькевич Ю. Г., Полещук Н. Н., Карапетян Г. М. Влияние гипоксии на морфофункциональное состояние культуры астроцитов и протектор-

ный эффект диафена // Сб. материалов конференции «Молекулярная генетика и биотехнология» 6–8 апреля 1998 г. – Минск, 1998. – С. 118–121.

6. *Шахтмейстер, И. Я.* Новый иммуно-корректор гроприносин в терапии дерматозов. Новые лек. преп. // Тезисы докладов VII Росс. Съезда дерматовенерологов. – М., 1994. – № 5. – С. 9–19.

Оригинальные научные публикации

7. *Vacigaluppi, M., Hermann D. M.* New targets of neuroprotection in ischemic stroke // *Scientific World Journal*. – 2008. – Т. 13, № 8. – P. 698–712.

8. *Ginsberg, M. D.* Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future // *Neuropharmacology*. – 2008. [Epub ahead of print].

Поступила 10.10.2017 г.