

Нейропротективный эффект фармакологического прекондиционирования дихолинсукцинатом в условиях экспериментального ишемического инсульта у крыс

И. А. Помыткин^{1*}, М. А. Магомедов², А. Г. Демченко³, М. В. Балясин^{3,4},
Н. В. Шишкин⁵, Р. А. Черпаков^{5*}, В. Н. Каркищенко¹

¹ Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства,
Россия, 143442, Московская обл., Красногорский р-он, п. Светлые Горы, вл. 1

² Городская клиническая больница № 1 им. Н. И. Пирогова Департамента здравоохранения г. Москвы,
Россия, 119049, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 8

³ Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова,
Россия, 115478, г. Москва, ул. Москва, ул. Москворечье, д. 1

⁴ Научно-образовательный ресурсный центр клеточных технологий,
Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы,
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

⁵ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Для цитирования: И. А. Помыткин, М. А. Магомедов, А. Г. Демченко, М. В. Балясин, Н. В. Шишкин, Р. А. Черпаков, В. Н. Каркищенко. Нейропротективный эффект фармакологического preconditionирования дихолинсукцинатом в условиях экспериментального ишемического инсульта у крыс. *Общая реаниматология*. 2025; 21 (5): 51–58. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2025-5-2570> [На русск. и англ.]

***Адрес для корреспонденции:** И. А. Помыткин, ipomytkin@mail.ru; Ростислав Александрович Черпаков, rcherpakov@fnkcrr.ru

Резюме

Инфаркт головного мозга по ишемическому типу на сегодняшний день является одной из наиболее приоритетных проблем здравоохранения. Несмотря на различие в вариантах течения ишемического и ишемически-реперфузионного повреждения нервной ткани, в конечном счете процент инвализации напрямую зависит от эффективности воздействия на зону пенумбра. Применение дихолинсукцината (ДХС) — нейронального инсулин-сенситайзера является перспективным фармакологическим методом лечения и профилактики последствий перенесенного инсульта.

Цель исследования. Изучить влияние фармакологического preconditionирования ДХС на гибель клеток мозга в условиях экспериментального ишемического инсульта у крыс.

Материалы и методы. Ишемический инсульт у крыс ($n=16$) моделировали введением вазоконстриктора эндотелина-1 (ЕТ-1) в стриатум. Эффект фармакологического preconditionирования с использованием ДХС как активного вещества оценивали, измеряя площадь инфаркта мозга в срезах мозга, окрашенных крезоловым фиолетовым. Влияние ДХС на показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования в первичной культуре клеток мозжечка крысы оценивали, измеряя скорость закисления внеклеточной среды и скорости поглощения кислорода, соответственно.

Результаты. Курсовое введение ДХС в режиме preconditionирования в течение 7 дней, один раз в день, в дозе 50 мг/кг *per os* снижает максимальную площадь зоны инфаркта мозга на 34% ($p<0,05$) по сравнению с контролем в условиях последующего экспериментального ишемического инсульта, вызванного введением ЕТ-1. Трехдневная инкубация первичной культуры мозжечка крыс с 50 мкМ ДХС не влияет на базовые уровни гликолиза ($p=0,916$) и дыхания в клетках ($p=0,8346$), но увеличивает гликолитический резерв клеток на 70,0% ($p<0,0001$) по сравнению с контролем.

Закключение. Впервые показан нейропротективный эффект фармакологического preconditionирования нейрональным инсулин-сенситайзером дихолинсукцинатом в условиях ишемического инсульта. Механизм действия ДХС связан с повышением гликолитического резерва клеток мозга, то есть с увеличением способности preconditionированных клеток вырабатывать АТФ и лактат посредством гликолиза в условиях острого падения окислительного фосфорилирования.

Ключевые слова: ишемический инсульт; фармакологическое preconditionирование; дихолина сукцинат; нейропротекция; эндотелин-1; крысы; гликолиз; окислительное фосфорилирование

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Neuroprotective Effect of Pharmacological Preconditioning with Dicholine Succinate in Experimental Ischemic Stroke in Rats

Igor A. Pomytkin^{1*}, Marat A. Magomedov², Anna G. Demchenko³, Maxim V. Balyazin^{3,4},
Nikolay V. Shishkin⁵, Rostislav A. Cherpakov^{5*}, Vladimir N. Karkishchenko¹

¹ Scientific Center for Biomedical Technologies, Federal Medical and Biological Agency,
Svetlye Gory village, bldg 1, 143442 Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia

² N.I. Pirogov City Clinical Hospital № 1, Moscow City Health Department,
8 Leninsky Ave., 119049 Moscow, Russia

³ Academician Bochkov Medical Genetics Research Center
1 Moskvorechye Str., 115478 Moscow, Russia

⁴ Scientific and Educational Resource Center for Cellular Technologies,
Patrice Lumumba Peoples Friendship University of Russia,
6 Miklukho-Maqlaya Str., 117198 Moscow, Russia

⁵ Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

Summary

Ischemic stroke is currently considered as one of the most pressing public health issues. Despite the differences in underlying mechanisms of ischemic and ischemic-reperfusion damage to the nervous tissue, the ultimate percentage of disability depends on intervention effects on the penumbra zone. The use of dicholine succinate (DCS), a neuronal insulin-sensitizer, is a promising pharmacological agent for management and prevention of stroke consequences.

The aim of the study was to investigate the effect of pharmacological preconditioning with DCS on brain cell death in experimental ischemic stroke in rats.

Materials and methods. Ischemic stroke in rats ($N=16$) was modeled by injecting the vasoconstrictor endothelin-1 (ET-1) into the striatum. The effect of pharmacological preconditioning with DCS as the active substance was evaluated by measuring the area of brain infarction in brain sections stained with cresyl violet. The effect of DCS on glycolysis and oxidative phosphorylation in primary cultures of rat cerebellum cells was assessed by measuring the rate of extracellular acidification and the rate of oxygen uptake, respectively.

Results. DCS administration in the preconditioning mode for 7 days, once a day orally, at a dose of 50 mg/kg, reduces the maximum area of the brain infarction zone by 34% ($P<0.05$) compared to the control in the subsequent experimental ischemic stroke induced by ET-1 administration. Three-day incubation of rat cerebellum primary culture with 50 μ M DCHS does not affect the basal levels of glycolysis ($P=0.916$) and cellular respiration ($P=0.8346$), but increases cellular glycolytic reserve by 70.0% ($P<0.0001$) compared to the control.

Conclusion. For the first time, the neuroprotective effect of pharmacological preconditioning with the neuronal insulin-sensitizer DCS in ischemic stroke has been shown. Mechanism of DCS action associates with an increase in the glycolytic reserve of brain cells, i.e., with increased ability of preconditioned cells to produce ATP and lactate via glycolysis in case of acutely compromised oxidative phosphorylation.

Keywords: *ischemic stroke; pharmacological preconditioning; dicholine succinate; neuroprotection; endothelin-1; rats; glycolysis; oxidative phosphorylation*

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Информация об авторах/Information about the authors:

Игорь Анатольевич Помыткин/Igor A. Pomytkin: <https://orcid.org/0000-0002-8426-3371>

Марат Адессович Магомедов Marat A. Magomedov: <https://orcid.org/0000-0002-1972-7336>

Анна Григорьевна Демченко/Anna G. Demchenko: <https://orcid.org/0000-0002-4460-7627>

Максим Витальевич Балясин/Maxim V. Balyazin: <https://orcid.org/0000-0002-3097-344X>

Николай Владимирович Шишкин/Nikolay V. Shishkin: <https://orcid.org/0009-0001-1621-4148>

Ростислав Александрович Черпаков/Rostislav A. Cherpakov: <https://orcid.org/0000-0002-0514-2177>

Владимир Николаевич Каркищенко/Vladimir N. Karkishchenko: <https://orcid.org/0000-0001-7145-0314>

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

Ишемический инсульт является основной причиной инвалидизации населения в России и остается третьей совокупной причиной смерти и инвалидности в мире [1]. Нарушение кровоснабжения вследствие эмболии, тромба, или спазма сосудов мозга ведет последовательно к гипоксии, падению уровней АТФ и фосфокреатина, аноксической деполяризации мембран нейронов, выбросу глутамата и развитию глутаматной эксайтотоксичности, а после растворения сгустка к массовому образованию активных форм кислорода и воспалительному ответу микроглии, что в совокупности ведет к гибели клеток мозга и формированию зоны некроза [2]. Несмотря на всю важность защиты нейронов в острейшем периоде инсульта, эта

проблема до сих пор не имеет фармакологического решения, а успешные доклинические экспериментальные испытания более чем 1000 веществ-кандидатов не привели к появлению нейропротекторов в клинической практике [3, 4]. Успехи в этой области связаны с открытием эффекта ишемического прекоондиционирования, когда кратковременный эпизод нелетальной ишемии снижает гибель клеток в последующем ишемическом эпизоде [5, 6]. Защитное действие ишемического прекоондиционирования включает адаптацию метаболизма клеток к условиям гипоксии, в частности повышение роли анаэробного гликолиза как источника АТФ и снижение активности энергопотребляющих процессов [7]. Центральную роль в адаптации к ишемии играет активация гипоксия-индуцируемого фактора 1 (HIF-1), регулирующую

щего транскрипцию более 700 генов, в том числе генов эритропоэтина (EPO), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ферментов гликолиза и транспортера глюкозы GLUT1 [8, 9]. Альтернативным активатором HIF-1 в условиях нормоксии является инсулин [10]. Так же, как и гипоксия, инсулин вызывает транскрипцию генов, в совокупности обеспечивающих адаптацию к гипоксии/ишемии, включая гены EPO, VEGF, GLUT1 и ферментов гликолиза [11–16]. Кроме того, имеются также ограниченные данные о preconditionирующем эффекте инсулина. Так, инсулин при интрацеребровентрикулярном введении снижал гибель нейронов гиппокампа СА3 у монгольских песчанок по сравнению с плацебо в последующем эпизоде кратковременной церебральной ишемии [17]. С учетом этих фактов preconditionирование с использованием средств, улучшающих инсулиновую сигнализацию в мозге, может представлять собой новый подход к защите нейронов в условиях ишемического инсульта.

Дихолинсукцинат (ДХС) представляет собой соль холина и янтарной кислоты (рис. 1, а) и проявляет свойства нейронального инсулин-сенситайзера, обладая способностью повышать фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах в ответ на низкие субоптимальные концентрации инсулина [18]. ДХС препятствует снижению когнитивной функции у крыс в условиях экспериментальной хронической церебральной гипоперфузии [18, 19]. Предварительное введение ДХС значительно снижает скорость падения макроэргов АТФ и фосфокреатина в мозге в последующем эпизоде глобальной ишемии, что было показано с использованием метода ^{31}P ЯМР *in vivo* [20]. Однако, вопрос, может ли ДХС снижать гибель клеток мозга в условиях ишемического инсульта при введении в режиме preconditionирования, остается открытым.

Цель исследования — изучить влияние фармакологического preconditionирования с использованием ДХС как активного вещества на гибель клеток мозга в условиях экспериментального ишемического инсульта у крыс.

Материал и методы

В исследовании применяли материалы Sigma-Aldrich (Merck, США).

Моделирование ишемического инсульта. Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар, средняя масса 200–250 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская обл. Животные получали стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р5. Водопроводную очищенную воду всем животным давали *ad libitum*. Животных

содержали в контролируемых условиях окружающей среды при температуре воздуха 18–22°C, относительной влажности 60–70% и искусственном освещении с циклом 12/12. Исследования проводили в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики (GLP)», Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 г. № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов». Все эксперименты были одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Протокол № 8 от 06.02.2024).

16 животных разделили на две группы. Первая группа получала физ. раствор (контроль), а вторая ДХС в дозе 50 мг/кг в 1 мл воды *per os* через желудочный зонд в течение 7 дней до индукции инсульта. Через сутки после последнего введения физ. раствора или ДХС крыс анестезировали 2,0% изофлурана в смеси закиси азота/кислорода в соотношении 70/30 по объему, помещали на стереотаксическую раму и поддерживали на анестезии 1–1,5% изофлурана в течение оставшейся части процедуры. Ректальный зонд контролировал температуру тела, нормотермию поддерживали подогреваемым одеялом. В черепе просверливали небольшое отверстие. Чтобы вызвать ишемическое повреждение мозга, 1 мкл физиологического раствора, содержащего 25 пмоль эндотелина-1 (ЕТ-1), вводили в левый стриатум в течение 2 мин с помощью стеклянной капиллярной иглы (кончик <50 мкм). Для стереотаксических инъекций использовали следующие координаты: кпереди от Брегмы +1,0 мм, латерально +3,0 мм и +4,5 мм в глубину от поверхности мозга. Через 24 ч после введения ЕТ-1 крыс подвергали глубокой анестезии и транскраниальной перфузии гепаринизированным физ. раствором с последующей фиксацией раствором формалина. Мозг быстро извлекали и замораживали в изопентане, охлажденном на сухом льду. Стриатум пошагово разделяли на секции на криостате (секции толщиной 20 мкм) с интервалом 80 мкм. Все срезы окрашивали крезоловым фиолетовым. Площадь максимальной зоны инфаркта регистрировали.

Культура клеток мозжечка. Мозжечок 5–7 дневных крыс линии Wistar, помещали в холодный раствор HBSS в/о $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ с добавлением 1 mM пирувата натрия, 10 mM HEPES, измельчали и инкубировали в 0,5% растворе трипсин-HBSS в/о $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ в течение 15 мин при 37°C. Полученную суспензию клеток отмывали дважды холодным раствором HBSS и центрифугировали при 1700 об/мин в течение 3 мин при +4°C. Осадок ресуспендировали в стандартной среде Neurobasal Medium с добавками: B-27 Supplement (50X), 2 mM GlutaMax, 20 mM KCl, 100 units/mL пеницилина, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ стрептомицина. Клетки засеивали в концентрации 1×10^5 клеток на лунку на стандартный 24-луночный планшет Seahorse XF 24, предварительно покрытый полиэтиленгликолем, культивировали при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Начиная с 7-х сут инку-

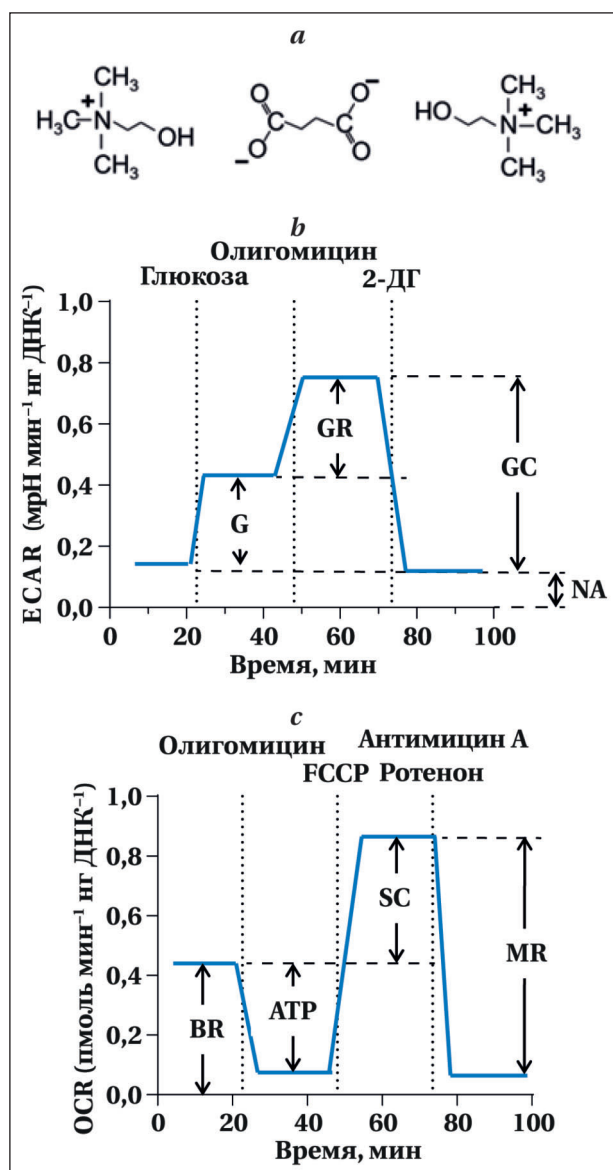


Рис. 1. Схема оценки влияния ДХС (а) на показатели гликолиза в гликолитическом стресс-тесте (b) и показатели окислительного метаболизма в митохондриальном стресс-тесте (с).

бации в образцы клеток исследуемой группы добавляли 50 μM ДХС или буфер (контроль), раз в день три дня подряд. Через 24 ч после последнего добавления ДХС или буфера проводили анализ метаболической активности клеток с использованием анализатора Seahorse XF 24 (Agilent Technologies) в соответствии с инструкцией производителя.

Оценка метаболической активности. Для оценки гликолитической активности клеток использовали стандартный протокол гликолитического стресс-теста (Seahorse glycolytic stress test, Agilent technologies). Клетки предварительно дважды промывали 500 $\mu\text{л}$ Ng-буфера (pH 7,4, 0,4 mM NaH_2PO_4 , 3,5 mM KCl, 120 mM NaCl, 5 mM HEPES, GlutaMAX, 1,3 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 2 mM пирувата натрия), затем инкубировали с 500 $\mu\text{л}$ Ng-буфера в течение 40 мин в термостате при 37°C без CO_2 , после чего определяли скорость

закисления внеклеточной среды (extracellular acidification rate, ECAR) в соответствии с инструкцией производителя. Базовый уровень гликолиза (G, glycolysis), гликолитическую емкость (GC, glycolytic capacity), гликолитический резерв (GR, glycolytic reserve) и не связанное с гликолизом закисление среды (NA, non-glycolytic acidification) при последовательном добавлении глюкозы, олигомицина и 2-деоксиглюкозы (2-ДГ) определяли как показано на рис. 1, b.

Для оценки окислительного фосфорилирования использовали стандартный протокол митохондриального стресс-теста (Seahorse Mito-stress test, Agilent technologies). Клетки предварительно дважды промывали 500 $\mu\text{л}$ N_m -буфера (pH 7,4, 0,4 mM NaH_2PO_4 , 3,5 mM KCl, 120 mM NaCl, 5 mM HEPES, GlutaMAX, 1,3 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM глюкозы), затем инкубировали с 500 $\mu\text{л}$ N_m -буфера в течение 40 мин в термостате при 37°C без CO_2 , после чего определяли скорость поглощения кислорода (oxygen consumption rate, OCR) в соответствии с инструкцией производителя. Базовый уровень дыхания (BR, basal respiration), максимальный уровень дыхания (MR, maximal respiration), производство АТФ (ATP) и резервную дыхательную емкость (SC, spare capacity) при последовательном добавлении олигомицина, протонофора FCCP и антимицина А с ротеноном определяли как показано на рис. 1, с.

Данные OCR и ECAR нормализовали по ДНК. Для этого ДНК выделяли из клеток по стандартному протоколу The ReliaPrep™ gDNA Tissue (Promega) и определяли количественно с использованием набора для флуоресцентного окрашивания QuantiFluor® dsDNA (Promega).

Статистический анализ проводили с помощью непарного двустороннего *t*-критерия Стьюдента, двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с апостериорным тестом Сидака (Sidak's test) для множественных сравнений между группами с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.8.3.0 («San Diego», США). Критерий Шапиро-Уилка применяли для выбора параметрических или непараметрических методов статистического анализа. Использовали следующие обозначения: *M* — среднее; *m* — стандартная ошибка; *n* — объем выборки; *p* — достигнутый уровень значимости. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для того, чтобы выяснить может ли фармакологическое preconditioning с использованием ДХС как активного вещества влиять на размеры зоны инфаркта мозга при последующем эпизоде ишемии, крысам-самцам Вистар вводили *per os* ДХС или физ. раствор один раз в день в течение 7 дней, а через 24 ч после последнего введения индуцировали ишемический инсульт инъекцией вазоконстриктора ET-1 в стриатум и определяли размеры зоны инфаркта в срезах мозга, полученных через 24 ч

после индукции инсульта (рис. 2). Сравнение средних значений максимальных площадей зоны инфаркта показало, что ДХС статистически значимо снижает максимальную площадь зоны на 34% ($p<0,05$) по сравнению с контролем.

В совокупности, полученные результаты показывают, что введение ДХС в режиме пре-кондиционирования может снижать гибель клеток мозга при последующем эпизоде ишемии.

Для того, чтобы выяснить связан ли ней-ропротективный эффект preconditionирования ДХС с его воздействием на метаболизм и, в частности, на показатели гликолиза в клетках мозга, первичную культуру клеток мозжечка крыс инкубировали в течение 3-х сут в присутствии ДХС или без него (контроль), после чего измеряли скорость закисления внеклеточной среды (ECAR) в присутствии добавок (рис. 3, а).

Выраженные в единицах ECAR такие показатели гликолиза, как базовый уровень гликолиза (G), гликолитическая емкость (GC), гликолитический резерв (GR) и не связанное с гликолизом закисление среды (NA) представили на рис. 3, b. Посредством двухфакторного анализа ANOVA выявили наличие статистически значимых отличий между группами по фактору «показатель гликолиза» ($F_{3,157}=157,0$; $p<0,0001$) и фактору «ДХС/контроль» ($F_{1,157}=52,28$; $p<0,0001$). Используя апостериорный тест Сидака показали, что ДХС статистически значимо увеличил на 50,5% гликолитическую емкость ($p<0,0001$) и на 70,0% гликолитический резерв клеток ($p<0,0001$) по сравнению с контролем, но не влиял на базовые уровни гликолиза ($p=0,916$) и на не связанное с гликолизом закисление среды ($p=0,699$).

Для того, чтобы выяснить влияет ли ДХС на окислительное фосфорилирование в клетках мозга, первичную культуру клеток мозжечка крыс инкубировали в течение 3-х сут в присутствии ДХС или без него (контроль), после чего измеряли скорость поглощения кислорода (OCR) в присутствии добавок (рис. 3, c). Выраженные в единицах OCR такие показатели окислительного метаболизма, как базовый уровень дыхания (BR), максимальный уровень дыхания (MR), производство АТФ (АТР) и резервная дыхательная емкость (SC) представили на рис. 3, d. Посредством двухфакторного анализа ANOVA выявили наличие статистически значимых отличий между группами по фактору «показатель окислительного метаболизма» ($F_{3,208}=249,0$; $p<0,0001$) и фактору «ДХС/контроль» ($F_{1,208}=17,28$; $p<0,0001$). Используя апостериорный тест Сидака показали, что ДХС статистически значимо снизил на 19,4% максимальный уровень дыхания ($p=0,0006$) и на 18,7% резервную дыхательную емкость ($p=0,014$) по сравнению с контролем, но не влиял на ба-

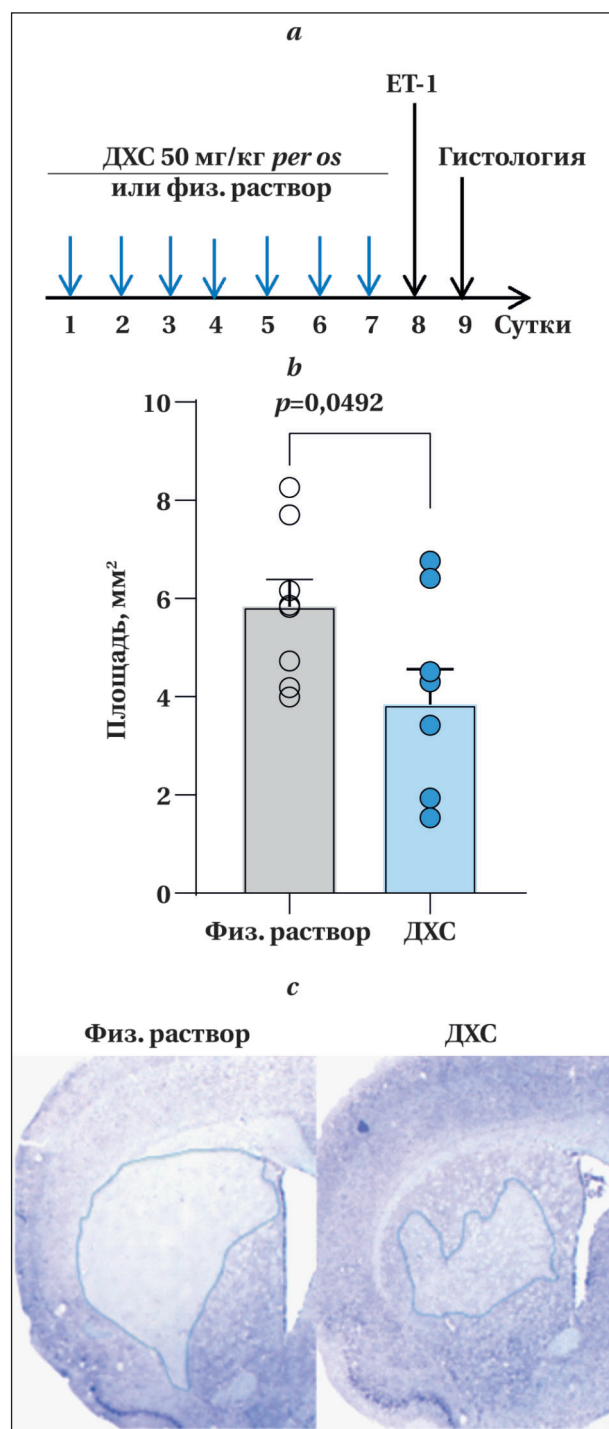


Рис. 2. Эффекты фармакологического preconditionирования с использованием ДХС как активного вещества на площадь и объем зоны инфаркта мозга крыс в условиях инсульта, вызванного введением вазоконстриктора ET-1. **Примечание.** а — расписание эксперимента; б — средние площади максимальной зоны инфаркта, мм²; в — репрезентативные гистологические изображения срезов мозга, окраска крезилловый фиолетовый. Результаты представили, как $M \pm m$ ($n=8$). * — $p<0,05$.

зовый уровень дыхания ($p=0,8346$) и на производство АТФ ($p=0,9596$).

В совокупности эти результаты показывают, что фармакологическое preconditionирование

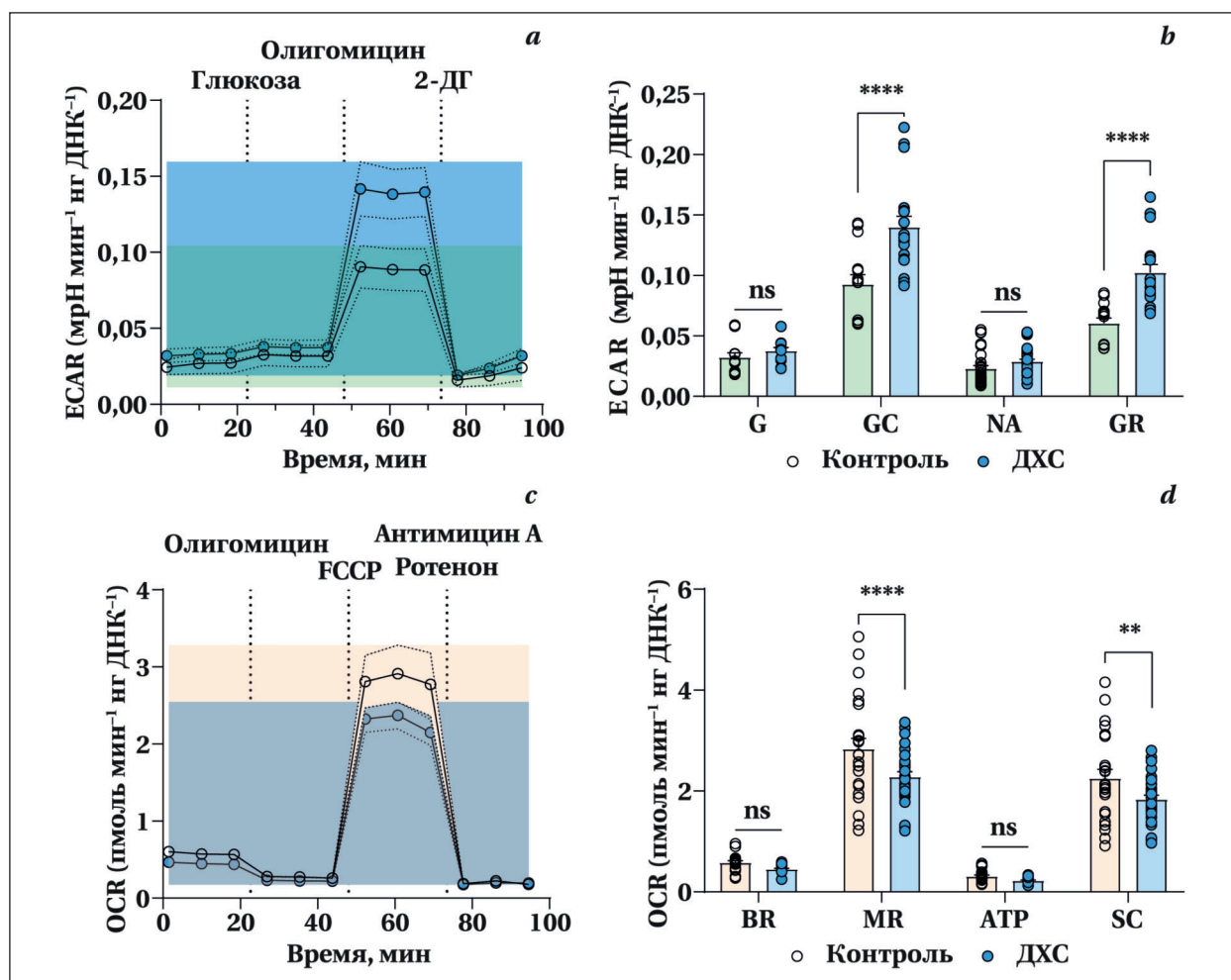


Рис. 3. Влияние ДХС на показатели гликолиза и окислительного метаболизма в первичной культуре клеток мозжечка крыс по данным анализа Seahorse.

Примечание. *a* — скорость закисления внеклеточной среды (ECAR) в присутствии добавок глюкозы, олигомицина и 2-деоксиглюкозы (2-ДГ); *b* — показатели гликолиза — базовый уровень гликолиза (G), гликолитическая емкость (GC), гликолитический резерв (GR) и не связанное с гликолизом закисление среды (NA); *c* — скорость поглощения кислорода (OCR) клетками в присутствии добавок олигомицина, протонофора FCCP, а также ротенона и антимицина А, ингибиторов митохондриальных комплексов I и III, соответственно; *d* — показатели окислительного метаболизма — базовый уровень дыхания (BR), максимальный уровень дыхания (MR), производство АТФ (ATP) и резервная дыхательная емкость (SC). Результаты представили, как $M \pm m$ ($n=15-30$). ** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,0001$; ns — незначимо.

с использованием ДХС повышает способность клеток мозга увеличивать скорость анаэробного превращения глюкозы в лактат в условиях острого дефицита окислительного фосфорилирования, не влияя на базовые показатели гликолиза и окислительного метаболизма.

Обсуждение

Фармакологическое preconditioning рассматривается как альтернативный гипоксическому preconditioning подходу к защите клеток мозга в условиях ишемии. В качестве кандидатов на роль фармакологических средств, обладающих подобным эффектом, исследовались соединения разных классов, в том числе фактор роста эритропоэтин, летучие анестетики (изофлуран), селективный открыватель митохондриальных калиевых каналов

диазоксид, хелатор железа дефероксамин, опиоиды [21] и инсулин [17]. В настоящей работе показали, что средства, улучшающие чувствительность к инсулину (инсулин-сенситайзеры), также могут рассматриваться как потенциальные нейропротекторы при их использовании в режиме preconditioning.

Дихолина сукцинат, нейрональный инсулин-сенситайзер, входит в качестве активного вещества в состав препарата для лечения ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде [22, 23]. В настоящем исследовании впервые продемонстрировали, что введение ДХС здоровым животным в режиме preconditioning является эффективным способом снижения размера зоны инфаркта мозга, возникающего при последующем эпизоде острого нарушения мозгового кровообращения.

Механизм preconditionирующего действия ДХС может быть связан с его метаболическими эффектами. Хотя ДХС не влиял на базовые показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования в первичной культуре клеток, он статистически значимо на 70% повышал гликолитический резерв, то есть способность клеток производить АТФ в условиях острого падения окислительного метаболизма. Этот эффект по-видимому лежит в основе нейропротективного действия ДХС и позволяет объяснить результаты раннего исследования, когда введение ДХС крысам Вистар в таком-же точно режиме preconditionирования значимо замедляло скорость падения содержания макроэргов АТФ и фосфокреатина в мозге при последующем эпизоде глобальной ишемии, вызванной остановкой сердца, [19]. Кроме того, защитный эффект ДХС может быть связан с повышением способности клеток производить лактат в свете того, что лактат обладает свойствами нейропротектора в условиях церебральной ишемии [24–27].

Снижение показателей максимального дыхания в preconditionированных клетках мозга

в среднем на 19,4%, по-видимому, также можно отнести к защитным эффектам ДХС, так как появление активных метаболитов кислорода, известных повреждающих факторов инсульта [28], прямо связано с повышенным потреблением кислорода в фазе реперфузии.

Закключение

В настоящей работе впервые показали нейропротективный эффект фармакологического preconditionирования нейрональным инсулин-сенситайзером дихолинсукцинатом в условиях ишемического инсульта. Выявили, что ДХС при профилактическом введении снижает размеры зоны инфаркта мозга в последующем эпизоде ишемии у крыс, вызванном введением вазоконстриктора эндотелина-1 в стриатум. Механизм действия ДХС связан с повышением гликолитического резерва клеток мозга, то есть повышением способности клеток, preconditionированных ДХС, увеличивать выработку АТФ и лактата посредством гликолиза в условиях острого снижения окислительного фосфорилирования.

Литература

1. Feigin V. L., Brainin M., Norrving B., Martins S., Sacco R. L., Hacke W., Fisher M., et al. World Stroke Organization (WSO): global stroke fact sheet 2022. *Int J Stroke*. 2022; 17 (1): 18–29. DOI: 10.1177/17474930211065917. PMID: 34986727.
2. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. Москва: Медицина; 2001. 328 с. Gusev E. I., Skvortsova V. I. Cerebral ischemia. Moscow: Medicine; 2001. 328 p (in Russ.).
3. O'Collins V. E., Macleod M. R., Donnan G. A., Horky L. L., van der Worp H. H., Howells D. W. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol*. 2006; 59 (3): 467–477. DOI: 10.1002/ana.20741. PMID: 16453316.
4. Lourbopoulos A., Mourouzis I., Xinaris C., Zerva N., Filippakis K., Pavlopoulos A., Pantos C. Translational block in stroke: a constructive and «out-of-the-box» reappraisal. *Front Neurosci*. 2021; 15: 652403. DOI: 10.3389/fnins.2021.652403. PMID: 34054413.
5. Murry C. E., Jennings R. B., Reimer K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74 (5): 1124–1136. DOI: 10.1161/01.CIR.74.5.1124. PMID: 3769170.
6. Liu Y., Kato H., Nakata N., Kogure K. Protection of rat hippocampus against ischemic neuronal damage by pretreatment with sublethal ischemia. *Brain Res*. 1992; 586 (1): 121–124. DOI: 10.1016/0006-8993 (92)91380-W. PMID: 1380876.
7. Li S., Hafeez A., Noorulla F., Geng X., Shao G., Ren C., Lu G., et al. Preconditioning in neuroprotection: from hypoxia to ischemia. *Prog Neurobiol*. 2017; 157: 79–91. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.001. PMID: 28110083.
8. Dengler V. L., Galbraith M., Espinosa J. M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014; 49 (1): 1–15. DOI: 10.3109/10409238.2013.838205. PMID: 24099156.
9. Dong P., Li Q., Han H. HIF-1 α in cerebral ischemia (Review). *Mol Med Rep*. 2022; 25 (2): 41. DOI: 10.3892/mmr.2021.12557. PMID: 34878158.
10. Zelzer E., Levy Y., Kahana C., Shilo B. Z., Rubinstein M., Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *EMBO J*. 1998; 17 (17): 5085–5094. DOI: 10.1093/emboj/17.17.5085. PMID: 9724644.
11. Pilakis S. J., Granner D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*. 1992; 54: 885–909. DOI: 10.1146/annurev.ph.54.030192.004321. PMID: 1562196.
12. Taha C., Mitsumoto Y., Liu Z., Skolnik E. Y., Klip A. The insulin-dependent biosynthesis of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in L6 muscle cells is mediated by distinct pathways. Roles of p21ras and pp70 S6 kinase. *J Biol Chem*. 1995; 270 (42): 24678–24681. DOI: 10.1074/jbc.270.42.24678. PMID: 7559581.
13. Masuda S., Chikuma M., Sasaki R. Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res*. 1997; 746 (1–2): 63–70. DOI: 10.1016/S0006-8993 (96)01186-9. PMID: 9037485.
14. Miele C., Rochford J. J., Filippa N., Giorgetti-Peradi S., Van Obberghen E. Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *J Biol Chem*. 2000; 275 (28): 21695–21702. DOI: 10.1074/jbc.M000805200. PMID: 10777488.
15. Treins C., Giorgetti-Peraldi S., Mordaca J., Semenza G. L., Van Obberghen E. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2002; 277 (31): 27975–27981. DOI: 10.1074/jbc.M204152200. PMID: 12032158.
16. Stiehl D. P., Jelkmann W., Wenger R. H., Hellwig-Bürgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 α by insulin and interleukin-1 β involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett*. 2002; 512 (1–3): 157–162. DOI: 10.1016/S0014-5793 (02)02247-0. PMID: 11852072.
17. Russo V., Candeloro P., Malara N., Perozziello G., Iannone M., Scicchitano M., Mollace R., et al. Key role of cytochrome C for apoptosis detection using Raman microimaging in an animal model of brain ischemia with insulin treatment. *Appl Spectrosc*. 2019; 73 (10): 1208–1217. DOI: 10.1177/0003702819858671. PMID: 31219322.
18. Storozheva Z. I., Proshin A. T., Sherstnev V. V., Storozhevych T., Senilova Y. E., Persyantseva N. A., Pinelis V. G., et al. Dicholine salt of succinic acid, a neuronal insulin sensitizer, ameliorates cognitive deficits in rodent models of normal aging, chronic cerebral hypoperfusion, and beta-amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia. *BMC Pharmacol*. 2008; 8: 1. DOI: 10.1186/1471-2210-8-1. PMID: 18215309.
19. Pomytkin I. A., Semenova N. A. Study of the effect of preconditioning with succinic acid salt of choline (1:2) on the disturbances of energy metabolism in the brain during ischemia by ³¹P NMR in vivo. *Dokl Biochem Biophys*. 2005; 403: 289–292. DOI: 10.1007/s10628-005-0094-7. PMID: 16229144.
20. Pomytkin I. A., Storozheva Z. I., Semenova N. A., Proshin A. T., Sherstnev V. V., Varfolomeev S. D. Neuroprotective effect of choline succinate in rats with experimental chronic cerebral ischemia evaluated by cognitive ability tests. *Biol Bull*. 2007; 34 (2): 144–147.
21. Esposito E., Desai R., Ji X., Lo E. H. Pharmacologic pre- and post-conditioning for stroke: Basic mechanisms and translational opportunity. *Brain Circ*. 2015; 1: 104–113. DOI: 10.4103/2394-8108.166380.

22. Помыткин И. А., Писарев В. В., Меркулов М. Е., Кузнецова Е. Б., Салина Е. А., Малыгин А. Ю., Каркищенко Н. Н. Результаты клинического исследования II фазы лекарственного препарата Дирекорд: рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, с параллельными группами, проспективное исследование по подбору оптимальной дозировки и изучению эффективности, безопасности и переносимости у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде. *Биомедицина*. 2023; 19 (3): 87–96. Pomytkin I. A., Pisarev V. V., Merkulov M. E., Kuznetsova E. B., Salina E. A., Malygin A. Yu., Karkishchenko N. N. Phase II of clinical trial of Direkord: randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group, and prospective study to select optimal dosage and to study the efficacy, safety, and tolerability in ischemic stroke patients in the early recovery period. *Biomedicine = Biomeditsina*. 2023; 19 (3): 87–96. (in Russ.). DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-87-96.
23. Помыткин И. А., Писарев В. В., Меркулов М. Е., Лукиных Л. В., Моржухина М. В., Каркищенко Н. Н. Результаты клинического исследования III фазы: многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое в параллельных группах исследование эффективности и безопасности лекарственного препарата Дирекорд у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде. *Биомедицина*. 2023; 19 (4): 81–93. Pomytkin I. A., Pisarev V. V., Merkulov M. E., Lukinykh L. V., Morzhukhina M. V., Karkishchenko N. N. Results of phase III clinical trial: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study of the efficacy and safety of Direkord in ischemic stroke patients in early recovery period. *Biomedicine = Biomeditsina*. 2023; 19 (3): 87–96. (in Russ.). DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-87-96.
24. Berthet C., Castillo X., Magistretti P. J., Hirt L. New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia: extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration. *Cerebrovasc. Dis.* 2012; 34 (5–6): 329–335. DOI: 10.1159/000343657. PMID: 23154656.
25. Jourdain P., Rothenfusser K., Ben-Adiba C., Allaman I., Marquet P., Magistretti P. J. Dual action of L-Lactate on the activity of NR2B-containing NMDA receptors: from potentiation to neuroprotection. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 13472. DOI: 10.1038/s41598-018-31534-y. PMID: 30194439.
26. Jourdain P., Allaman I., Rothenfusser K., Fiumelli H., Marquet P., Magistretti P. J. L-Lactate protects neurons against excitotoxicity: implication of an ATP-mediated signaling cascade. *Sci Rep.* 2016; 6: 21250. DOI: 10.1038/srep21250. PMID: 26893204.
27. Cerina M., Levers M., Keller J. M., Frega M. Neuroprotective role of lactate in a human *in vitro* model of the ischemic penumbra. *Sci Rep.* 2024; 14: 7973. DOI: 10.1038/s41598-024-58669-5. PMID: 38575687.
28. Sanderson T. H., Reynolds C. A., Kumar R., Przyklenk K., M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol.* 2013; 47 (1): 9–23. DOI: 10.1007/s12035-012-8344-z. PMID: 23011809.

Поступила 16.04.2025

Принята 09.09.2025

Опубликовано онлайн 30.09.2025