

ЗУХУРОВА М. А.¹, СТАРКОВ А. В.¹,
СТАРОВОЙТ А. В.¹, БАРКОВСКАЯ А. А.¹,
ВЛАСОВ Т. Д.^{1,2}

Гипоксическое и фармакологическое preconditioning как механизмы защиты при фокальной ишемии головного мозга крысы

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова.

² Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург
e-mail: linamg_2@mail.ru

Реферат

Цель настоящего исследования заключалась в изучении возможности защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения физическим (гипоксия) или фармакологическим (L-теанин) факторами, а также возможности усиления эффективности каждого из них суммацией их действия. Эксперименты выполнялись на крысах линии Вистар массой 220–260 г. Животных подвергали воздействию умеренной гипоксии прерывистым режимом (10 % O₂ в течение 90 мин) трехкратно в течение трех дней, после чего вызывали ишемию головного мозга (ОСМА) продолжительностью 30 мин. В качестве фармакологического фактора нами был использован L-теанин (гамма-глутамилэтиламид). L-теанин растворялся в физиологическом растворе в концентрации 6,1 μM (1 мг/мл) и вводился внутривентрикулярно в объеме 0,25 мл за 30 мин до ишемии в дозе 1 мг/кг. Кроме того, исследовалась группа животных, которым применялось сочетание гипоксии и введение L-теанина. И применение гипоксического preconditioning, и введение L-теанина уменьшало размер зоны повреждения головного мозга крыс. Сочетание защитных факторов не приводило к дальнейшему увеличению защитного эффекта.

Ключевые слова: ишемия мозга, ишемическое preconditioning, гипоксия, L-теанин.

Zuhurova M. A.¹, Starkov A. V.¹, Starovoyt A. V.¹,
Barkovskaya A. A.¹, Vlasov T. D.^{1,2}

Hypoxic and pharmacological preconditioning as a mechanism of protection during focal cerebral ischemia in rats

¹ I. P. Pavlov Federal Medical University, Saint-Petersburg, Russian Federation

² V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center, Saint-Petersburg, Russian Federation

e-mail: linamg_2@mail.ru

Abstract

The purpose of this study was to examine the possibility of protecting the brain from ischemic and reperfusion injury with the physical (hypoxia) or pharmacological (L-theanine) factors, as well as opportunities to strengthen the effectiveness of each of them by combining their actions. Experiments were conducted on Wistar rats weighing 220–260. The animals were exposed to moderate hypoxia of intermittent duty (10 % O₂ for 90 min) three times during the three days, after which the brain ischemia was evoked (MCAO) with the duration of 30 min. We have used L-theanine (gamma-glutamylethylamide) as a pharmacological factor. L-theanine was dissolved in saline at a concentration of 6,1 μM (1 mg/ml) and injected intraperitoneally in the volume of 0,25 ml 30 min before ischemia in doses of 1 mg/kg. There has also been another group of animals, to which both L-theanine and hypoxia have been applied. Results. Both the use of hypoxic preconditioning, and the introduction of L-theanine have reduced the size of the damaged zone in the brain of the rats. The combination of protective factors did not lead to further increase of the protective effect.

Keywords: ischemia of brain, ischemic preconditioning, hypoxia, L-theanine.

Введение

Нейропротекция и ускорение восстановления больных, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, до сих пор являются одними из самых актуальных задач в медицине. Фармакологическое лечение нередко оказывает недостаточный эффект или приводит к неблагоприятным последствиям. Известно, ткань мозга очень уязвима к ишемическому и гипоксическому состоянию, поэтому нарушения мозгового кровообращения (циркуляторная гипоксия-ишемия, гипоксемическая гипоксия, гипобарическая гипоксия и др.) вызывают глубокие нарушения структуры и функций нейронов мозга, неврологические расстройства [4, 23]. В конце прошлого века был обнаружен феномен ишемической/гипоксической толерантности мозга, в основе которого лежит возрастание резистентности нейронов мозга к последующей их гибели по типу некроза или апоптоза после одного или нескольких кратковременных эпизодов ишемии или гипоксии [15, 17]

В литературе для обозначения этого феномена используется термин «ишемическое/гипоксическое preconditionирование». Влияние preconditionирования интенсивно изучается при различных моделях нарушений кислородного обеспечения и кровоснабжения, и имеются многочисленные результаты о характеристиках ишемического preconditionирования (ПреК), степени его защитного эффекта и при воспроизведении ишемии головного мозга [5, 7, 24]. Еще одним направлением нейропротекции является применение фармакологических веществ, которые влияют либо на метаболизм нейронов, либо на механизмы отсроченной гибели нейронов. Одним из таких веществ является L-теанин (гамма-глутамилэтиламид), открытый в 1949 г. Y. Sakato [26], L-теанин является естественным аналогом глутамата, который конкурентно связывается и блокирует глутаматные рецепторы. В работах Kakuda et al. показано, что теанин связывается с глутаматными рецепторами подтипа альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-изоксазол-4-пропионат (AMPA) и N-метил-D-аспартат (NMDA) в кортикальных нейронах у крыс. Показано, что блокирующий эффект теанина на AMPA-рецептор приблизительно в 10 раз больше, чем при действии на NMDA-рецептор [11]. Антагонисты AMPA-рецептора обеспечивают защиту от ишемии, индуцированной окклюзией средней мозговой артерии у крыс [14] и передней мозговой артерии у песчанок и у крыс [13]. При глобальной ишемии в экспериментах на мышах также показано, что введение L-теанина в желудочки головного мозга замедляло гибель нейронов области CA1-гиппокампа. Многократная инъекция L-теанина интравентрикулярно уменьшала размер инфаркта головного мозга у мышей [10].

Цель исследования

Изучить эффективность гипоксического preconditionирования, фармакологического preconditionирования L-теанином при экспериментальной ишемии/реперфузии головного мозга крысы, а также оценить возможности усиления эффективности каж-

дого из протективных воздействий при сочетанном применении.

Материал и методы исследования

В экспериментах использовались крысы-самцы линии Вистар, возраст 14–16 недель, массой 220–260 г. Животные размещались в клетках по пять крыс со свободным доступом к еде и питьевой воде. В лаборатории поддерживалась управляемая температура 24 °С и соблюдался световой режим с искусственным освещением с 07:00 до 20:00.

Все эксперименты проводились под анестезией хлоралгидратом в дозе 430 мг/кг.

L-теанин (*Taiyo Kagaku*, Япония) растворялся в физиологическом растворе в концентрации 6,1 μ M (1 мг/мл) и вводился внутривентрикулярно в объеме 0,25 мл за 30 мин до ишемии в дозе 1 мг/кг.

Preconditionирование умеренной гипобарической гипоксией проводилось в барокамере проточного типа путем трехкратного «подъема» животных на высоту 5 км (360 мм рт. ст.) длительностью 90 мин, с интервалом 24 часа.

На третьи сутки после воздействия гипоксии была произведена операция. Ишемия головного мозга воспроизводилась с помощью модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (СМА) по методике J. Koizumi et al., 1986 [18] в модификации E. Z. Longa et al., 1989 [22] и L. Belayev et al. (1999) [3]. Полипропиленовая нить (4-00) длиной 22 мм, обработанная силиконом и поли-L-лизином, вводилась ретроградно в левую наружную сонную артерию, после чего проводилась через внутреннюю сонную артерию к устью СМА. Продолжительность ишемии составляла 30 минут с последующей реперфузией 48 часов.

Исследовались четыре группы животных.

1. Контрольная (n=8). Животным воспроизводилась ишемия головного мозга последующей реперфузией.
2. Гипоксическое preconditionирование (n=6).
3. Внутривентрикулярное введение L-теанина за 30 мин до ишемии в дозе 1 мг/кг (n=7).
4. Гипоксическое preconditionирование + внутривентрикулярное введение L-теанина за 30 мин до ишемии в дозе 1 мг/кг (n=6).

Степень повреждения головного мозга оценивалась на вторые сутки после операции с помощью морфологического метода, а также с помощью оценки параметров неврологического дефицита.

Исследование размера очага повреждения.

После завершения 48-часового послеоперационного периода головной мозг извлекался, разрезался на участки толщиной 2 мм. Фронтальные срезы мозга инкубировали в 0,2 % растворе трифенилтетразолия хлорида (TTC) (*MP Biomed*, США) при температуре 37,0 °С в течение 15 мин. Затем с помощью специального аппаратного комплекса получали цифровые фотографии передней и задней поверхности срезов на которых измерялась площадь зоны повреждения. Полученные результаты были обработаны в программе ImageJ для получения относительной площади повреждения отдельной стороны каждого среза, затем

Таблица 1

Показатель Группа	Коэфф. асимметрии $S_{\text{пп}}/S_{\text{общ}}$	Размер некроза		Статистическая достоверность (p)	
		$S_{\text{повр}}/S_{\text{общ}}$	$S_{\text{повр}}/S_{\text{пп}}$	$S_{\text{пп}} \text{ vs. } S_{\text{общ}}$	$S_{\text{повр}} \text{ vs. } S_{\text{общ}}$
Контроль (n=8)	52,50±1,29	12,26±2,69	23,32±4,96	—	—
Гипоксическое преконди- ционирование (n=6)	51,40±2,6	7,99±1,89	15,40 ±3,31	0,654	<0,001
L-теанин (n=7)	51,77±1,46	4,69±1,99	9,11±3,99	0,017	0,001
Гипоксия+ L-теанин (n=6)	51,20±2,14	5,72±1,28	11,20±2,26	0,001	<0,001

Примечание: $S_{\text{пп}}/S_{\text{общ}}$: процентное отношение площади поврежденного полушария ($S_{\text{пп}}$) к площади всего фронтального среза мозга (коэффициент асимметрии). $S_{\text{повр}}/S_{\text{общ}}$ — процентное отношение площади некроза ($S_{\text{повр}}$) к площади всего фронтального среза мозга. $S_{\text{повр}}/S_{\text{пп}}$ — процентное отношение площади некроза ($S_{\text{повр}}$) к площади поврежденного полушария ($S_{\text{пп}}$).

вычисляли средний показатель для каждого среза, и средний показатель площади повреждения каждого мозга. Степень повреждения головного мозга оценивалась также косвенно, по коэффициенту асимметрии полушарий. Определялось процентное отношение площади поврежденного полушария (левого) ($S_{\text{пп}}$) к площади всего фронтального среза мозга ($S_{\text{общ}}$). У здорового животного отношения левого полушария к площади всего мозга равен 50 %.

Оценка неврологического состояния животных производилась по шкале J. N. Garcia et al. (1995) [6], которая состоит из шести критериев. По каждому из них крыса может получить максимальный балл — 3 (норма) и минимальный балл — 0–1 (тяжелое нарушение). Таким образом, максимальное возможное количество баллов — 18. Количество баллов, данное каждой крысе по завершении испытания, представляет собой сумму результатов всех шести отдельных тестов. Тестирование проводилось перед опытом и через день после операции в фиксированное время для исключения изменений поведения за счет циркадного ритма и в той же клетке, в которой содержалось это животное.

Критерии:

1. спонтанная активность — пятиминутное наблюдение за крысой в клетке, активность крысы определяется ее способностью достигать всех четырех стенок клетки. При этом, 3 балла — крыса двигается по периметру клетки, активное исследовательское поведение, за время наблюдения крыса достигает как минимум трех стенок клетки. 2 балла — неуверенность в движениях (задержка в выборе направления), крыса достигает менее трех стенок клетки, хотя иногда пытается становиться на верхний край стенки клетки. 1 балл — крыса практически не двигается и не пытается вставать на край клетки. 0 баллов — полное отсутствие движений;

2. симметричность движения конечностей — крыса поднимается за хвост, определяется степень движения и вовлеченность в движение контралатераль-

ных ишемизированному полушарию конечностей. 3 балла — все конечности участвуют в движении симметрично, 2 балла — асимметрия скорости движения на контралатеральной очагу стороне, 1 балл — минимальные движения контралатеральных очагу конечностей, 0 баллов — передняя контралатеральная конечность не двигается;

3. симметричность движения передних конечностей — крыса передвигается на передних лапах. Баллы те же, что и в п. 2;

4. подъем по сетчатой стенке — крыса помещается на решетку, оценивается участие конечностей в движении: норма — 3 балла, слабость и отставание контралатеральных очагу конечностей — 2 балла, неспособность подъема — 1 балл;

5. проприорецепция тела — оценивается реакция (поворот головы) на прикосновение тупым предметом к туловищу крысы справа или слева. Баллы: 3 — норма, 2 — замедление реакции при раздражении контралатеральной стороны, 1 — отсутствие реакции;

6. реакция на прикосновение к вибриссам — баллы проставляются аналогично п. 5.

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета StatSoft Statistica v6.0 Multilingual. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Все показатели были представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение». Значения $P < 0,05$ рассматривались как значимые.

Результаты исследования

В контрольной группе у всех животных наблюдалось значительное повреждение головного мозга относительной площадью 23,32 % от площади поврежденного полушария и 12,26 % от общей площади фронтального среза всего мозга. Коэффициент асимметрии составил 52,50 %, что также свидетельствует об отеке поврежденного полушария головного мозга.

Во второй группе крыс, которые подвергались гипоксическому preconditionированию, отмечалось достоверное уменьшение повреждения головного мозга, и площадь повреждения составила 15,40 % от площади поврежденного полушария и 7,99 % ($p < 0,001$) — от общей площади фронтального среза. Коэффициент асимметрии (51,40 %) достоверно не отличался от показателей контрольной группы ($p = 0,654$). В третьей группе (preconditionирование L-теанином) площади повреждения от площади поврежденного полушария и от общей площади фронтального среза составили 9,12 % и 4,69 %, соответственно ($p = 0,001$), и отмечалось достоверное уменьшение коэффициента асимметрии 51,77 % ($p = 0,017$). У крыс четвертой группы также отмечалось уменьшение повреждения головного мозга площади повреждения от площади поврежденного полушария и от общей площади фронтального среза — 11,20 % и 5,72 %, ($p = 0,001$) и коэффициента асимметрии — 51,20 % ($p = 0,001$) соответственно, однако достоверной разницы между показателями, полученными в группах 2, 3 и 4 — не отмечалось (табл. 1).

Таким образом, нами получены данные, которые доказывают эффективность нейропротективного эффекта гипоксического preconditionирования, фармакологического preconditionирования L-теанином, а также при сочетании этих воздействий, хотя ожидаемого суммирования гипоксического и фармакологического воздействий не отмечалось.

При проведении теста по шкале Гарсия все крысы до операции имели оценку 18 баллов (норма); на вторые сутки после ишемии головного мозга при повторном проведении теста у всех животных наблюдалось нарушение координации движений, что свидетельствует о неврологических расстройствах. Так, крысы контрольной группы имели в среднем $12,63 \pm 1,51$ балла. Во всех опытных группах наблюдались достоверно менее выраженные неврологические нарушения. Так, в группе с гипоксией крысы имели в среднем $16,83 \pm 0,98$ балла ($p = 0,001$ по сравнению с контролем), в группе с L-теанином — $14,53 \pm 1,72$ балла ($p = 0,045$ по сравнению с контролем), в группе гипоксия + L-теанин — $17,00 \pm 0,89$ баллов ($p = 0,0002$ по сравнению с контролем).

Таким образом, у животных, которые подвергались воздействию гипоксии и L-теанина, наблюдалось улучшение исследовательского поведения, увеличивалась сила мышц, ориентировочное движение на проволочной клетке, симметричность движения конечностей, особенно вовлеченность в движение контралатеральных ишемизированному полушарию конечностей.

Обсуждение результатов

В данной работе впервые показано, что совместное применение гипоксического preconditionирования головного мозга и теанина в доишемического периода не приводит к взаимному усилению указанных нейропротективных воздействий, хотя каждое из них обладает достоверным защитным эффектом.

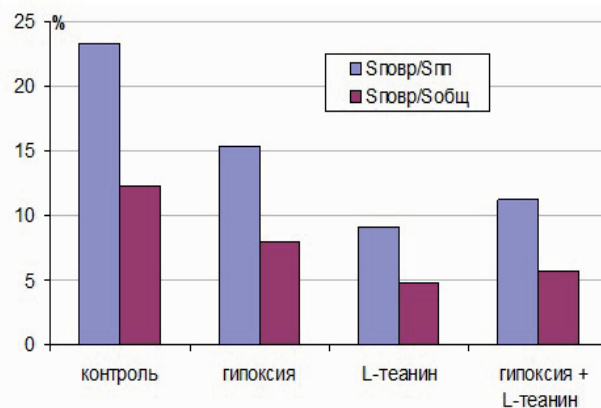


Рис. 1. Показатели повреждения головного мозга: отношение площади некроза к площади всего фронтального среза мозга ($S_{\text{повр}}/S_{\text{пп}}$) и к площади поврежденного полушария ($S_{\text{повр}}/S_{\text{общ}}$)

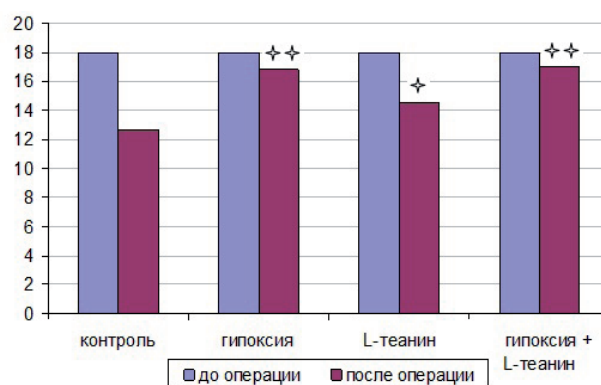


Рис. 2. Показатели неврологического состояния крыс по шкале Гарсия (в баллах). ** — $p < 0,01$; * — $p < 0,05$

Известно, что выраженная гипоксия является фактором, который вызывает повреждение ткани головного мозга и приводит к гибели нейронов, что сопровождается ухудшением памяти, обучаемости, нарушением поведения и другими расстройствами [3, 4]

Однако гипоксия, не приводящая к повреждению нейронов, выступает как фактор, увеличивающий устойчивость ткани головного мозга к последующему ишемическому/реперфузионному повреждению. J. Liu et al. (1997, 1998) показано, что постишемическое восстановление ткани головного мозга у животных при глобальной ишемии усиливается гипоксией [19–20]. Происходившая регенерация ткани головного мозга сопровождалась улучшением сенсомоторных и пространственных/познавательных способностей [8, 28].

Гипоксия как preconditionирующий фактор увеличивала толерантность ткани головного мозга при моделировании глобальной ишемии у песчанок [11, 16], крыс [11, 21, 25], при фокальной ишемии мозга у крыс [25, 27], мышей [27].

В нашем исследовании животные подвергались воздействию интермиттирующей гипоксии трехкратным «подъемом» на высоту 5000 м в течение 90 мин,

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

после чего воспроизводилась ишемия. Данное гипоксическое воздействие приводило к уменьшению размера некроза и уменьшению неврологического дефицита.

Таким образом, наши результаты подтвердили возможность увеличения устойчивости ткани головного мозга под действием гипоксии.

Другим способом ограничения ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга является применение L-теанина. В ряде работ ранее изучался механизм протективного действия теанина при ишемии головного мозга. Как уже отмечалось, в механизмах формирования гипоксической толерантности существенное значение принадлежит глутаматергической сигнальной трансдукции [13–15, 22].

Большой интерес представляет изучение совместного эффекта различных прекодирующих воздействий, в частности, фармакологического прекодиирования и прекодиирования физическими факторами. В настоящей работе была предпринята попытка проанализировать эффект одновременного использования гипоксической тренировки и введения теанина. Сочетанное применение этих воздействий не сопровождалось их взаимным усилением, хотя по показателю размера некроза,

коэффициенту асимметрии (отек головного мозга) сочетание двух прекодирующих факторов сопровождалось несколько более выраженным защитным эффектом, чем гипоксия, хотя различия между группами были недостоверными.

Вероятно, L-теанин вызывает защитное действие, близкое к максимальному, в связи с чем усиление этого эффекта применением гипоксического воздействия не дополняет протективного эффекта.

Выводы

1. Гипоксия в режиме (10 % O₂ по 90 мин, 3 дня) оказывает достоверное защитное действие при экспериментальной шемии/реперфузии головного мозга у крыс.

2. Введение L-теанина в дозе 1 мг/кг за 30 минут до 30 мин ишемии головного мозга крысы уменьшает размер некроза и неврологический дефицит.

3. Сочетанное применение L-теанина в дозе 1 мг/кг и гипоксии (10 % O₂ по 90 мин, 3 дня) не сопровождается усилением их эффектов, полученных при их раздельном использовании как прекодирующих факторов.

Литература

1. Balduini, W. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats / W. Balduini [et al] // *Brain Res.* — 2000. — № 859. — P. 318–325.
2. Balduini, W. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats / W. Balduini // *Brain Res.* — 2000. — № 859. — P. 318–325.
3. Belayev, L. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine : neurological and histological validation / L. Belayev [et al] // *Brain Res.* — 1999. — № 833 (2). — P. 181–90.
4. Block, F. Global ischemia and behavioral deficits / F. Block // *Prog. Neurobiol.* — 1999. — № 58. — P. 279–295.
5. Dirnagl, U. Endogenous neuroprotection : mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? / U. Dirnagl, A. Meisel // *Neuropharmacology.* — 2008. — № 55. — P. 334–344.
6. Garcia, J. H. Early reperfusion as a rationale from of therapy in ischemic stroke / J. H. Garcia // *Rev. Neurol.* — 1995. — № 23 (123). — P. 1067–1073.
7. Glazier, S. S. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain / S. S. Glazier [et al] // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* — № 14 (4). — P. 545–553.
8. Guo Shao. Hypoxic Preconditioning Improves Spatial Cognitive Ability in Mice Neurosignals / Guo Shao [et al]. — 2006. — P. 314–321.
9. Kakuda, T. Inhibition by theanine of binding of [3H] AMPA, [3H] kainate, and [3H] MDL 105519 to glutamate receptors / T. Kakuda [et al] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2002. — № 66. — P. 2683–2686.
10. Kakuda, T. Protective effect of γ -glutamylethylamide (theanine) on ischemic delayed neuronal death in gerbils // T. Kakuda // *Neurosci. Lett.* — 2000. — № 289. — P. 189–192.
11. Kato, H. Induction of NADPH-diaphorase activity in the hippocampus in a rat model of cerebral ischemia and ischemic tolerance / H. Kato [et al] // *Brain Res.* — 1994. —

№ 652. — P. 71–75.

12. Kato, H. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil : cumulative damage and protective effects / H. Kato [et al] // *Brain Res.* — 1991. — № 553. — P. 238–242.

13. Kawasaki-Yatsugi, S. Neuroprotective effect of YM-90K, an AMPA receptor antagonist, against delayed neuronal death induced by global cerebral ischemia in gerbils and rats, Jpn. S. Kawasaki-Yatsugi [et al] // *J. Pharmacol.* — 1997. — № 74. — P. 253–260.

14. Kawasaki-Yatsugi, S. YM90K, an AMPA receptor antagonist, protects against ischemic damage caused by permanent and transient middle cerebral artery occlusion in rats, Naumyn-Schmiedeberg's Arch / S. Kawasaki-Yatsugi [et al] // *Pharmacol.* — 1998. — № 358. — P. 586–591.

15. Kirino, K. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons / K. Kirino [et al] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1991. — № 11. — P. 299–307.

16. Kirino, T. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons / T. Kirino, Y. Tsujita, A. Tamura // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* — 1991. — № 11. — P. 299–307.

17. Kitagawa, K. «Ischemia tolerance» phenomenon found in the brain / K. Kitagawa, M. Masumoto, M. Tgaya // *Brain Res.* — 1990. — № 528. — P. 21–24.

18. Koizumi, J. Experimental studies of ischemic brain edema : a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area / J. Koizumi [et al] // *Jpn. J. Stroke.* — 1986. — № 8. — P. 1–8.

19. Liu, J. BrdU uptake into dividing microglia/macrophages occurs in striatum prior to hippocampus following global ischemia in the gerbil / J. Liu [et al] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1997. — № 17. — P. S422.

20. Liu, J. Increased neurogenesis in the dentate gyrus

- after transient global ischemia in gerbils / J. Liu [et al] // *J. Neurosci.* — 1998. — № 18. — P. 7768–7778.
21. Liu, Y. Protection of rat hippocampus against ischemic neuronal damage by pretreatment with sublethal ischemia / Y. Liu [et al] // *Brain Res.* — 1992. — № 586. — P. 121–124.
22. Longa, E. Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats / E. Z. Longa [et al] // *Stroke.* — 1989. — № 20 (1). — P. 84–91.
23. Naritomi, H. (1988) Flow thresholds for cerebral energy disturbance and Na⁺ pump failure as studied by in vivo ³¹P and ²³Na nuclear magnetic resonance spectroscopy / H. Naritomi [et al] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1988. — № 8. — P. 16–23.
24. Obrenovitch, T. P. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia / T. P. Obrenovitch // *Physiol. Rev.* — 2008. — № 88. — P. 211–247.
25. Purshottam, T. Hypoxia tolerance in rats in relation to tissue glycogen levels / T. Purshottam, U. Kaveeshwar, H. D. Brahmachari // *Aviat. Space Environ. Med.* — 1978. — № 49. — P. 1062–1064.
26. Sakato, Y. The chemical constituents of tea : f new amide theanine / Y. Sakato [et al] // *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* — 1949. — № 23. — P. 262–267.
27. Stenzel-Poore, M. P. 103 Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia : similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states / M. P. Stenzel-Poore // *Lancet.* — 2003. — № 362 (9389). — P. 1007–1008.
28. Wurm, F. Effects of skilled forelimb training on hippocampal neurogenesis and spatial learning after focal cortical infarcts in the adult rat brain / F. Wurm [et al] // *Stroke.* — 2007. — № 38. — P. 2833–2840.