УДК [616.8-005 + 616-005.4]

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-65-71

В. О. МУРОВЕЦ, М. В. ЛЕНЦМАН

Нейропротекторная эффективность креатин-аминокислотного комплекса в модели ишемического инсульта у крыс

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии имени И. П. Павлова»
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6
e-mail: MLensman@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 05.04.19; принята к печати 11.10.19

Резюме

Введение. По данным ВОЗ, инсульт и его последствия занимают 2-е место по смертности после ишемической болезни сердца. Сотни клинических исследований дали лишь одно разрешенное к применению средство – внутривенное введение рекомбинантного активатора плазминогена, т. е. средство для реканализации. Средства для эффективной нейропротекции, несмотря на огромное число исследований, так и остаются не найденными. **Цель работы** – *in vivo* изучение нейропротекторного действия нового амида креатина (АС-PfA) в отношении неврологических и когнитивных нарушений в модели ишемического инсульта у крыс. **Материал и методы.** Модель инсульта (ФИМ) воспроизводили путем окклюзии проксимального участка средней мозговой артерии. Неврологические нарушения оценивали по латентности инициации движения (ЛИД), для исследования когнитивных нарушений использовалась пространственная версия водного теста Морриса. В исследовании использованы 4 группы животных: (1) негативного контроля (ФИМ с в/б-введением физиологического раствора); (2) позитивного контроля (ФИМ с управляемой гипотермией); (3) исследуемого вещества (ИБ, ФИМ с в/б-введением АС-PfA) и (4) ложнопериоперированных животных. **Результаты.** По сравнению с негативным контролем животные, получавшие АС-PfA, демонстрировали более низкую латентность инициации движений уже через день после ФИМ, что свидетельствует о лучшем функциональном состоянии базальных ганглиев и ассоциативных областей коры. Гипотермия во время ФИМ полностью устраняла эффект увеличения ЛИД. В водном тесте Морриса животные, получавшие АС-PfA, в отличие от группы негативного контроля, демонстрировали снижение времени поиска платформы по ходу обучения, а в пробной попытке статистически достоверно отличались по таким показателям, как время на периферии и число пересечений места локализации платформы. Гипотермия не была столь эффективна – животные этой группы обучались медленнее, хотя в пробную попытку уже не отличались от группы с ИБ. **Выводы.** Новое производное креатина – его комплексное соединение с аминокислотами – обладает выраженной лечебной эффективностью в отношении когнитивных нарушений, а также улучшает функциональное состояние систем контроля двигательной активности животных после инсульта. При этом по силе положительного воздействия оно превосходит или приближается к воздействию гипотермии, известной как эффективный нейропротекторный прием.

Ключевые слова: инсульт, прижизненные модели инсульта, крысы, нейропротекция, креатин, аналоги креатина

Для цитирования: Муровец В. О., Ленцман М. В. Нейропротекторная эффективность креатин-аминокислотного комплекса в модели ишемического инсульта у крыс. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2019;18(4):65–71. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-65-71.

UDC [616.8-005 + 616-005.4]

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-65-71

V. O. MUROVETS, M. V. LENTSMAN

Neuroprotective efficiency of creatine-aminoacid complex compound in the model of ischemic stroke in rats

Pavlov Institute of Physiology of Russian Academy of Sciences, Russia, St. Petersburg
6 nab. Makarova, St. Petersburg, Russia, 199034
e-mail: MLensman@yandex.ru

Received 05.04.19; accepted 11.10.19

Summary

Introduction. According to WHO data, stroke and its consequences rank second in mortality after coronary heart disease. Hundreds of clinical trials have yielded only one tool that can be used – intravenous administration of recombinant plasminogen activator, i.e. recanalization agent. The means for effective neuroprotection, despite the huge number of studies, remain not found. The **aim** of the work was *in vivo* study of neuroprotective effect of creatine amide (AC-PfA) on neurological and cognitive impairment in a model of ischemic stroke in rats. **Material and methods.** The model of stroke (FCI) was reproduced by occlusion of middle cerebral artery proximal segment. Neurological deficits were assessed by the latency of movement initiation (LMI), cognitive impairments – by a spatial version of Morris water maze. Four groups of animals were used: (1) negative control (FCI with administration of saline), (2) positive control (FCI with controlled hypothermia), (3) test substance (FCI with administration of AC-PfA) and (4) sham-operated animals. **Results.** Compared with negative control group, animals

treated with AC-PfA showed lower latency of movement initiation a day after FCI, what indicates a better functional state of the basal ganglia and associative areas of the cortex. Hypothermia during FCI completely eliminated the effect of increasing LMI. In Morris water maze, animals treated with AC-PfA, in contrast to the negative control group, showed a decrease in platform search time during training, and in a probe trial differed statistically significantly in peripheral searching time and the number of crossings of the platform localization site. Hypothermia was not so effective, although not statistically significantly differs from the group with AC-PfA. **Conclusions.** A new derivative of creatine has a pronounced therapeutic efficacy in relation to cognitive impairment, and improves the functional state of the systems, controlling the motor activity of animals. At the same time, it exceeds or approaches the effects of hypothermia, known as an effective neuroprotective technique.

Keywords: stroke, in-vivo stroke models, rats, neuroprotection, creatine, creatine analogs

For citation: Mourovets V. O., Lentsman M. V. Neuroprotective efficiency of creatine-aminoacid complex compound in the model of ischemic stroke in rats. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2019;18(4):65–71. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-65-71.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения [1], инсульт и его последствия занимают второе место по смертности, уступая лишь ишемической болезни сердца. С 1990 г. наблюдается неуклонный рост встречаемости заболевания [2]. Когнитивные и неврологические нарушения, сопровождающие инсульт, являются причиной тяжелой инвалидизации и требуют многомиллиардных затрат на лечение и последующую реабилитацию, зачастую не вполне успешную [3]. Предлагаемые методы лечения инсульта можно подразделить на две категории – (а) реканализацию, т. е. оперативное восстановление кровотока в пенумбре – области, пока еще необратимо не затронутой ишемическим поражением, и (б) – нейропротекцию, направленную на защиту нейронов от гибели во время ишемии [4, 5]. Интенсивные поиски в течение последних трех десятилетий, включавшие сотни контролируемых многоцентровых клинических исследований, дали лишь одно разрешенное FDA (в 1996 г.) средство – внутривенное введение рекомбинантного активатора плазминогена, т. е. средство для реканализации [6–8]. Наряду с реканализацией, в клинической практике апробируется использование терапевтической гипотермии для нейропротекции [9, 10]. Фармацевтические же средства нейропротекции, несмотря на огромное число исследований, так и остаются не найденными [6, 7, 11]. Таким образом, поиск эффективных нейропротекторных средств по-прежнему остается одной из самых актуальных задач экспериментальной и клинической неврологии.

Одним из ключевых факторов «ишемического каскада», от которого зависит степень нейрональных повреждений, является энергетический статус клеток мозга. Ишемия приводит к истощению запасов высокоэнергетических соединений в клетках мозга, в частности, фосфокреатина (ФКр) и АТФ, что заканчивается их гибелью. В связи с этим нами была предложена рабочая гипотеза о том, что системное введение креатина способно увеличивать мозговое содержание высокоэнергетических фосфатов и ослаблять степень ишемических поражений. Гипотеза получила подтверждение в исследованиях на срезах мозга *in vitro*, в которых аппликация креатина (Кр) повышала уровень ФКр и АТФ в среде и защищала нейроны от аноксического повреждения, а также на прижизненной модели глобальной ишемии мозга у крыс, у которых интрацеребровентрикулярное (ИЦВ) введение Кр оказывало выраженное противоишемическое действие, как по гистологическим параметрам

нейрональных поражений, так и на основе данных расширенного неврологического и поведенческого тестирования [12–14]. ИЦВ-введение, однако, малопригодно для клинического использования.

Критически важной проблемой успешной нейропротекции в клинике является доставка препаратов через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [15]. Сам Кр является сильно поляризованной молекулой и через ГЭБ даже при системном введении проникает медленно и ограниченно [16]. В связи с этим возникла необходимость поиска, разработки и синтеза производных Кр с хорошей проницаемостью ГЭБ. Дальнейшие исследования подтвердили правильность выбранного подхода. Ранее нами были исследованы бензиловый эфир Кр [17], а также комплексные соединения Кр и КрФ с ацетатом магния (Cr/PCr-Mg-CPLX) [18], которые показали их способность проникать через ГЭБ, высокую эффективность при аноксии *in vitro*, а также высокую нейропротекторную эффективность *in vivo* [19, 20, 16].

Для доставки Кр через ГЭБ в ткань мозга при парентеральном введении нами совместно с сотрудниками Института высокомолекулярных соединений РАН были разработаны, синтезированы и химически охарактеризованы новые вещества на основе амидов Кр, сохраняющие сродство к креатинкиназе и характеризующиеся улучшенной способностью проникать через ГЭБ [21–25].

Целью работы было *in vivo* изучение нейропротекторного действия амида креатина креатинил-фенилаланина (АС-PfA), перспективного по данным предыдущих исследований *in vitro*, а также показанной ранее способностью уменьшать объем повреждения мозга по морфологическим критериям *in vivo* [26], в отношении неврологических и когнитивных нарушений в модели инсульта у крыс.

Материал и методы исследования

Исследование проведено в соответствии с принципами Базельской декларации под контролем Комиссии по биоэтике Института физиологии им. И. П. Павлова РАН. В работе использованы половозрелые самцы белых крыс линии Вистар-Киото массой 300–350 г, выращенные в виварии ИФ РАН (ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН», Программа по сохранению и развитию биоресурсных коллекций ФАНО России). Животные содержались в клетках типа Т4 по 4–5 при регулируемом световом (12/12 ч) и температурном режиме (22±1 °С), имели свободный доступ к пище (гранулированный корм, «Волосово») и воде. Модель перманентной фокальной ишемии мозга (ФИМ) вос-

производилась согласно [27] под комбинированным наркозом (Золетил/Домитор, внутривенно, в/б) путем окклюзии высокочастотной электрокоагуляцией (аппарат ЭХВЧ-25-1-С, «Медия», Россия) проксимального участка средней мозговой артерии (СМА) на протяжении 1,5–2,5 мм под контролем операционного микроскопа (МТ-2, ЛОМО, Россия). Процедура имитации ФИМ (ложная операция) была аналогичной, но без электрокоагуляции СМА. Температура тела животного в ходе операции поддерживалась на уровне $38 \pm 0,5$ °C с помощью электрогрелки, управляемой ректальным термодатчиком. У животных группы с гипотермией в течение 180 мин после индуцирования ишемии поддерживалась пониженная температура тела 33 – 34 °C. Через 2 недели после операции производилась эвтаназия.

Неврологические нарушения оценивали по латентности инициации движения (ЛИД-тест) в интерпретации [28], путем измерения времени, затрачиваемого животным на то, чтобы выйти за пределы квадрата 20×20 см, расположенного в центре стандартной установки открытого поля ($1 \times 1 \times 0,5$ м). Тестирование проводили за 1 день до и через 1, 3, 7 и 14 дней после ишемии.

Для исследования когнитивных нарушений использовалась пространственная версия водного теста Морриса (ВТМ) [29] – стандартного теста для исследования процессов обучения и памяти [30]. Установка ВТМ представляла из себя бассейн диаметром 145 см и высотой 50 см, заполненный на 25 см водой $t=24$ °C, замутненной добавлением небольшого количества мела, в центре одного из квадрантов (так называемый целевой квадрант) которого располагалась скрытая платформа (диаметр – 12 см, заглубление – 1 см). Помещение с установкой освещалось рассеянным светом двух 250 Вт ламп накаливания. Обучение в ВТМ проводили начиная с 7 дня после ФИМ в течение пяти дней. Ежедневная серия состояла из четырех 60-секундных попыток на поиск платформы из разных стартовых точек. Как показатель обучения использовали среднее время поиска (латентность) в блоке из четырех попыток. В 30-секундные интервалы между попытками крыса находилась в стандартной клетке вне помещения с установкой. На 5-й день через 0,5–1 ч после последней попытки платформу из бассейна изымали и проводили так называемую пробную попытку продолжительностью 60 с для оценки «успешности» освоения теста, при которой с помощью телекамеры, размещенной над бассейном, производилась видеорегистрация поискового поведения животного. Последующий анализ видеозаписи производился с использованием программы для приложения «ИМАQ Vision», в среде LabVIEW 7 (National Instruments, USA), позволяющей выделить характеристики пространственного обучения: длину траектории поиска, число пересечений места платформы, время поиска в целевом квадранте и на периферии у стенок бассейна (в пределах так называемого аннулюса – полосы шириной 20 % от диаметра бассейна).

В исследовании использованы 4 группы животных: (1) негативного контроля (ФИМ с в/б-введением физиологического раствора, $n = 12$); (2) позитивного

контроля (ФИМ с управляемой гипотермией, $n=9$); (3) исследуемого вещества (ФИМ с в/б-введением АС-PfA, $n = 9$) и (4) ложнооперированных животных ($n=9$). Исследуемое вещество (АС-PfA в 0,9 % растворе хлорида натрия (растворение непосредственно перед введением; 150 мг/кг/введение) и вещество негативного контроля (0,9 % раствор хлорида натрия) вводились в/б через 20–30, 90 и 150 мин после ФИМ. Доза и режим введения ИВ выбраны на основе результатов расчетов биодоступности, а также пилотных экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Выбор гипотермии в качестве позитивного контроля обосновывается тем, что на данный момент гипотермия – единственное эффективное и клинически апробированное средство нейропротекции. Поскольку в работе исследовалось потенциально нейропротективное средство, гипотермия была включена в качестве контроля. Подробнее обоснование выбора позитивного контроля описано ниже.

Статистический анализ проводился с помощью пакета программ «Statistica 7.0» (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Все результаты представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки средней. Анализ данных ЛИД-теста и по ходу обучения в ВТМ проводился с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с повторными измерениями. Данные пробных попыток в ВТМ анализировали с использованием однофакторного ANOVA; во всех случаях множественные парные сравнения осуществляли по критерию Фишера наименьшей значимой разницы (критерий Фишера НЗР). Был принят уровень значимости различий $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

ЛИД-тест (рис. 1) показал различия между группами, связанные с разной временной динамикой восстановления двигательной активности ($p < 0,01$, ANOVA с повторными измерениями); при этом группа негативного контроля значимо отличалась от остальных (при $p < 0,02$ и ниже, критерий Фишера НЗР). Группа негативного контроля сразу после ФИМ демонстрировала резкий рост латентности инициации движения, которая возвращалась к базовому уровню только через 7 дней после операции ($p < 0,001$). Ложнооперированные животные день ото дня увеличивали время выхода из центрального квадрата (первый и последний тесты значимо отличаются при $p < 0,05$), что, вероятно, отражает габитуацию к однообразной окружающей обстановке. Гипотермия во время ФИМ полностью устраняла эффект увеличения ЛИД. Комплекс креатина с аминокислотами (АС-PfA) также оказывал положительный эффект на функциональное состояние животных с ФИМ: по сравнению с негативным контролем животные, получавшие ИВ, демонстрировали статистически значимо более низкую ЛИД через день после ФИМ ($p < 0,01$, критерий Фишера НЗР). Кроме того, поскольку группы не отличались на 7-й день после ФИМ, можно заключить, что к началу обучения в ВТМ физиологические системы моторного контроля у всех групп восстанавливались.

В ВТМ все группы с ФИМ показали достоверно большую латентность поиска платформы, чем

Рис. 1. Неврологические нарушения в тесте на латентность инициации движения. Символами обозначены статистически значимые межгрупповые отличия, выявленные с использованием критерия Фишера НЗР: ** – $p < 0,01$ – между группой с ИВ и негативным контролем; § – $p < 0,05$ и ниже – отличия негативного контроля от ЛО, гипотермии

Fig. 1. Neurological disturbances in the movement initiation test. Statistical significant between group differences evaluated with Fisher LSD test are marked with: ** – $p < 0,01$ – between AC-PfA and negative control groups; § – $p < 0,05$ and less – between negative control and sham or hypothermic group. Horizontal axis – Day after focal cerebral ischemia; Vertical axis – Latency to initiate movement (s)

ложнооперированные, в течение всего периода обучения (при $p < 0,05$ и ниже, критерий Фишера НЗР). При этом у группы негативного контроля ФИМ полностью нарушала обучение в тесте (попытки статистически не отличаются друг от друга), в то время как группы, подвергнутые гипотермии или получавшие ИВ, демонстрировали обучение (рис. 2, а). Группа, получавшая ИВ, значительно отличалась от группы негативного контроля в последние 2 дня обучения ($p < 0,05$, критерий Фишера НЗР) и фактически среди групп с ФИМ демонстрировала самые низкие латентности поиска платформы в течение всего обучения. Гипотермия не была столь эффективна, хотя статистически значимо не отличалась от группы с ИВ. Анализ пробных попыток (рис. 2, б–г) показал, что все группы с ФИМ имели нарушения долговременной пространственной памяти (отличия от ложнооперированных с $p < 0,02$, однофакторная ANOVA). Независимо от воздействия, все они показали уменьшение времени поиска в секторе платформы, однако по таким показателям, как время на периферии и, особенно, число пересечений места локализации платформы, животные, получавшие ИВ, статистически значимо отличались от группы негативного контроля ($p < 0,05$), а группы, подвергнутые гипотермии, отличались с пограничной вероятностью.

Полученные результаты свидетельствуют, что новое производное креатина – АС-PfA – оказывает выраженное положительное действие на функциональное состояние животных с ФИМ: по сравнению с негативным контролем животные, получавшие ИВ, демонстрировали статистически значимо более низкую латентность инициации движений уже через день после ФИМ (рис. 1). Данная комплексная

задача оценивает эффективность работы мозговых систем, отвечающих за планирование и выполнение двигательных (локомоторных) реакций, а также уровень ориентировочно-исследовательской мотивации животного, что в целом хорошо характеризует функциональное состояние животного. Нарушения инициации движения связывают, прежде всего, с расстройствами деятельности нигрострионигральной системы допаминовых рецепторов [31]. В нашем случае, когда известно, что хроническая ФИМ вызывает морфологические нарушения базальных ганглиев и ассоциативных областей коры [32, 33], снижение времени, необходимого животному для инициации горизонтальной ориентировочно-исследовательской локомоторной активности, свидетельствует о лучшем функциональном состоянии данных систем.

В водном тесте Морриса животные, получавшие ИВ, в отличие от группы негативного контроля, демонстрировали обучение. Группа, получавшая ИВ, значительно отличалась от группы негативного контроля в последние 2 дня обучения ($p < 0,05$, критерий Фишера НЗР) и фактически среди групп с ФИМ демонстрировала самые низкие латентности поиска платформы в течение всего обучения (рис. 2, а). В то же время гипотермия не была столь эффективна, хотя статистически значимо животные не отличались от группы с ИВ. Анализ пробных попыток показал (рис. 2, б–г), что все группы с ФИМ имели нарушения долговременной пространственной памяти. Независимо от воздействия, все они показали уменьшение времени поиска в секторе платформы, однако по таким показателям, как время на периферии и, особенно, число пересечений места локализации платформы, животные, получавшие ИВ, статистически достоверно отличались от группы негативного контроля, а группы, подвергнутые гипотермии, отличались с пограничной вероятностью.

Таким образом, применение амида креатинил-фенилаланина по силе положительного воздействия по разным показателям превосходило или приближалось к воздействию гипотермии – известного нейропротекторного приема. Эффективность гипотермии как средства протекции от травмирующих агентов в широком смысле известна очень давно, высокая эффективность уже показана в клинике травматических поражений головного мозга [34]. Относительно недавно гипотермия была испытана для лечения ишемического поражения головного мозга [9, 35]. В частности, высокая эффективность гипотермии была подтверждена на моделях острого инсульта [36]. Основные сведения о влиянии гипотермии в разных моделях ФИМ получены морфологическими методами, в ряде работ использовались простые неврологические шкалы, и почти нет данных о влиянии гипотермии на когнитивные нарушения при перманентной ФИМ. Для обеих моделей ФИМ (преходящей и перманентной) имеются данные об эффективности гипотермии в отношении неврологических нарушений [37]. Результаты клинического применения также указывают на высокую эффективность гипотермии, в том числе против функциональных нарушений [9, 35].

Рис. 2. Когнитивные нарушения в водном тесте Морриса (а) и пробных попытках после окончания теста (б–г) у крыс после ФИМ: а – сравнение групп ложнооперированного контроля (ЛО, белые квадратики), негативного контроля с ФИМ (ФИМ, черные квадратики), ФИМ с ИВ AC-PfA (AC-PfA, черные ромбики) и ФИМ с гипотермией (ГТ, незаполненные кружки); б – время поиска в целевом секторе (%); в – число пересечений места локализации платформы; г – поиск на периферии (%). Символами обозначены статистически значимые межгрупповые отличия, выявленные с использованием критерия Фишера НЗР: * – $p < 0,05$ между группой с ИВ и негативным контролем; # – $p < 0,05$ и ниже – между ЛО и всеми остальными; § – $p < 0,05$ и ниже – отличия негативного контроля от ЛО, гипотермии, AC-PfA

Fig. 2. Cognitive disturbances during Morris water maze task acquisition (a) and probe trial after test (б–г) after focal cerebral ischemia: а – task acquisition in the sham group (open squares), negative control (black squares), AC-PfA (black rhomb) and hypothermia (open circles) group. Horizontal axis – day of learning (test block); Vertical axis – latency to find a hidden platform (s); б – time to search in target quadrant (s); в – platform crossings; г – periphery time (s). Horizontal axis – groups: sham (open bars), negative control (black bars), AC-PfA (grey bars) and hypothermia (checked bars). Statistical significant between group differences evaluated with Fisher LSD test are marked with: * – $p < 0.05$ – between AC-PfA and negative control groups; # – $p < 0.05$ and less – between sham and all others group

В нашей работе получены данные о наличии положительного влияния гипотермии в отношении когнитивных и неврологических расстройств, вызванных перманентной ФИМ. Таким образом, она может быть хорошим позитивным контролем для исследуемых лекарств. Тот факт, что ИВ показало сходную или даже более высокую эффективность, свидетельствует в пользу правильности выбранного подхода.

Заключение

Производное креатина – его комплексное соединение с аминокислотами – обладает выраженной лечебной эффективностью в отношении когнитивных нарушений, а также улучшает функциональное состояние систем контроля двигательной активности животных при ишемии. При этом по силе положительного воздействия на восстановление когнитивных нарушений оно превосходит, а по эффективности снижения неврологических нарушений приближается к воздействию

гипотермии, хорошо известного нейропротекторного приема. Результаты представляемой работы, наряду с данными тестирования других синтезированных аналогов, служат основой для дальнейшего целенаправленного поиска оптимальных стратегий модификации молекулы креатина. Конечной целью является разработка принципиально нового, патогенетического подхода к терапии и профилактике инсультов и ишемии мозга в категории нейропротекции за счет устранения дефицита энергетического статуса ткани. В перспективе такие препараты смогут заполнить существующий на данный момент пробел в специфической терапии инсультов, а также существенно дополнить комплекс мероприятий для профилактики инсульта у пациентов, относящихся к «группе риска».

Благодарности

Работа выполнена при поддержке программы «Интегративная физиология» Отделения физиологии и фундаментальной медицины РАН.

Исследуемое вещество было синтезировано и передано для настоящего исследования в Институте высокомолекулярных соединений РАН доктором медицинских наук С. В. Буровым с коллегами.

Acknowledgements

Study was supported by «Integrative Physiology» program of Department of physiology and fundamental medicine Russian Academy of Sciences.

Tested compound was synthesized and provided for study by Sergey V. Burov and colleagues, Institute of High Molecular Compounds, Russian Academy of Sciences.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. World Health Organization Global Health Observatory (GHO) data; Mortality and global health estimates. Available at: https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/ (accessed: 04.06.2019).
2. Krishnamurthi RV, Moran AE, Feigin VL, Barker-Collo S, Norrving B, Mensah GA, Taylor S, Naghavi M, Forouzanfar MH, Nguyen G, Johnson CO, Vos T, Murray CJ, Roth GA; GBD 2013 Stroke Panel Experts Group. Stroke Prevalence, Mortality and Disability-Adjusted Life Years in Adults Aged 20-64 Years in 1990–2013: Data from the Global Burden of Disease 2013 Study. *Neuroepidemiology*. 2015;45(3):190–202. Doi: 10.1159/000441098.
3. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;35(10):e146–e603. Doi: 10.1161/CIR.0000000000000485.
4. Broderick JP, Hacke W. Treatment of acute ischemic stroke part I: Recanalization strategies. *Circulation*. 2002;106:1563–1569. Doi: 10.1161/01.cir.0000030406.47365.26.
5. Broderick JP, Hacke W. Treatment of acute ischemic stroke part II: Neuroprotection and medical management. *Circulation*. 2002;106:1736–1740. Doi: 10.1161/01.cir.0000030407.10591.35.
6. Furlan AJ. Challenges in acute ischemic stroke clinical trials. *Curr. Cardiol. Rep.* 2012;14(6):761–766. Doi: 10.1007/s11886-012-0311-9.
7. Neuhaus AA, Rabie T, Sutherland BA, Papadakis M, Hadley G, Cai R, Buchan AM. Importance of preclinical research in the development of neuroprotective strategies for ischemic stroke. *JAMA Neurol*. 2014;71(5):634–639. Doi: 10.1001/jamaneurol.2013.6299.
8. Bhaskar S, Stanwe P, Cordato D, Attia J, Levi C. Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: dawn of a new era? *BMC Neurology*. 2018;18(1):8. Doi: 10.1186/s12883-017-1007-y.
9. Hong JM, Lee JS, Song HJ, Jeong HS, Choi HA, Lee K. Therapeutic hypothermia after recanalization in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. 2014;45:134–140. Doi: 10.1161/strokeaha.113.003143.
10. Gu LJ, Xiong XX, Ito T, Lee J, Xu BH, Krams S, Steinberg GK, Zhao H. Moderate hypothermia inhibits brain inflammation and attenuates stroke-induced immunodepression in rats. *CNS Neurosci Ther*. 2014;20(1):67–75. Doi: 10.1111/cns.12160.
11. Chamorro A. Neuroprotectants in the Era of Reperfusion Therapy. *Journal of Stroke*. 2018;20(2):197–207. Doi: 10.5853/jos.2017.02901.
12. Rebaudo R, Melani R, Carita F, Rosi L, Picchio V, Ruggeri P, Izvarina N, Balestrino M. Increase of cerebral phosphocreatine in normal rats after intracerebroventricular administration of creatine. *Neurochemical Research*. 2000;25(11):1493–1495. Doi: 10.1023/A:1007628226044.
13. Balestrino M, Lensman M, Parodi M, Perasso L, Rebaldo R, Melani R, Polenov S, Cupello A. Role of Cr and PCr in neuronal protection from anoxic and ischemic damage. *Amino Acids*. 2002;23(1–3):221–229. Doi: 10.1007/s00726-001-0133-3.
14. Lensman M, Korzhevskii D, Mourouets V, Kostkin V, Izvarina N, Perasso L, Gandolfo C, Otellin V, Polenov S, Balestrino M. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. *Brain Res*. 2006;1114(1):187–194. Doi: 10.1016/j.brainres.2006.06.103.
15. Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Molecular Interventions*. 2003;3(2):90–105. Doi: 10.1124/mi.3.2.90.
16. Perasso L, Lunardi GL, Risso F, Pohvozheva AV, Leko MV, Gandolfo C, Florio T, Cupello A, Burov SV, Balestrino M. Protective effects of some creatine derivatives in brain tissue anoxia. *Neurochemical Research*. 2008;33(5):765–775. Doi: 10.1007/s11064-007-9492-9.
17. Vennerstrom JL, Miller DW. Creatine ester pronutrient compounds and formulations. Patent. Patent number WO0222135. USA, 2002.
18. Wheelwright DC, Ashmead SD. Bioavailable chelates of creatine and essential metals. Patent. Patent number US 6.114.379. 2000.
19. Заявка РФ, МПК 7 А61К 31/661/2. Противоишемический препарат / Применение бензилового эфира креатина в качестве противоишемического препарата / С. А. Поленов, М. В. Ленцман, В. О. Муровец и др.; приоритет 02.04.06. [Polenov CA, Lencman MV, Murovec VO, Izvarina NL, Burov SV, Pohvoshheva AV. Patent application RU, MPK 7 A61K 31/661/2. Anti-Ischemic Drug / Administration of creatine benzyl ester as the anti-ischemic drug. Priority 02.04.06. (In Russ.)].
20. Lunardi G, Parodi A, Perasso L, Pohvozheva AV, Scaroni S, Adriano E, Florio T, Gandolfo C, Cupello A, Burov SV, Balestrino M. The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience*. 2006;142(4):991–997. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.06.058.
21. Burov S, Leko M, Dorosh M, Dobrodumov A, Veselkina O. Creatinyl amino acids – new hybrid compounds with neuroprotective activity. *J. Pept. Sci.* 2011;17:620–626. Doi: 10.1002/psc.1379.
22. Патент 2428414 РФ. Способ получения амидов креатина / С. В. Буров, О. С. Веселкина, М. В. Лeko; заявл. 11.03.2009; опубл. 10.09.2011. [Burov SV, Veselkina OS, Leko MV. Method of producing creatine amides. Patent. Patent number RU 2428414. 11.03.2009. (In Russ.)].
23. Заявка WO2010074591A1 РФ. Амиды креатина, способ их получения, средство, обладающее нейропротекторным действием / С. В. Буров, А. Н. Хромов; опубл. 01.07.2010; приоритет 24.12.2008. [Burov SV, Khromov AN. Creatine amides, a method for the production thereof and an agent exhibiting a neuroprotective action. Patent. Patent number WO2010074591A1. Priority 24.12.2008. (In Russ.)].
24. Burov SV, Khromova NV, Khromova AA, Khromov PA. Amides of creatine, method of their preparation, and remedy possessing a neuroprotective activity. Patent. Patent number US 8.350.077 B2. 08.01.2013.
25. Burov SV, Veselkina OS, Leko MV. Process for preparing creatine amides. Patent. Patent number US 8.735.623 B2. 27.05.2014.

26. Власов Т. Д., Чефу С. Г., Байса А. Е. и др. Амиды креатина: перспективы нейропротекции. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. – 2011. – Т. 97, № 7. – С. 708–717. [Vlasov TD, Chifu SG, Bajsa AE, Leko MV, Burov SV, Veselkina OS. Amidy kreatina: perspektivy nejroprotekcii. *Russian Journal of Physiology*. 2011;97(7):708–717. (In Russ.)].
27. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17:472–476. Doi: 10.1161/01.STR.17.3.472.
28. Golani I, Wolgin DL, Teitelbaum P. A proposed natural geometry of recovery from akinesia in the lateral hypothalamic rat. *Brain Res*. 1979;164(1–2):237–267. Doi: 10.1016/0006-8993(79)90019-2.
29. Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. 1981;12(2):239–260. Doi: 10.1016/0023-9690(81)90020-5.
30. Vorhees CV, Williams MT. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. *Neurotoxicology and Teratology*. 2014;45(A):93–108. Doi: 10.1016/j.ntt.2014.07.003.
31. Hauber W. Impairments of movement initiation and execution induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors are reversed by a blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*. 1996;73(1):121–130. Doi: 10.1016/0306-4522(96)00036-x.
32. Markgraf CG, Green EJ, Hurwitz BE, Morikawa E, Dietrich WD, McCabe PM, Ginsberg MD, Schneiderman N. Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*. 1992;575(2):238–246. Doi: 10.1016/0006-8993(92)90085-n.
33. Yonemori F, Yamada H, Yamaguchi T, Uemura A, Tamura A. Spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1996;16(5):973–980. Doi: 10.1097/00004647-199609000-00022.
34. Dietrich WD, Bramlett HM. Therapeutic hypothermia and targeted temperature management in traumatic brain injury: Clinical challenges for successful translation. *Brain Res*. 2016;1640(A):94–103. Doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.034.
35. Schwab S, Schwarz S, Spranger M, Keller E, Bertram M, Hacke W. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 1998;29(12):2461–2466. Doi: 10.1161/01.str.29.12.2461.
36. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1987;7:729–738. Doi: 10.1038/jcbfm.1987.127.
37. Worp HB van der, Sena ES, Donnan GA, Howells DW, Macleod MR. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain*. 2007;130(12):3063–3074. Doi: 10.1093/brain/awm083.

Информация об авторах

Муровец Владимир Олегович – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург, e-mail: mourovets@mail.ru.

Леншман Михаил Валерьевич – канд. мед. наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург, e-mail: mlensman@yandex.ru.

Authors information

Murovets Vladimir O. – PhD, senior research scientists, Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, e-mail: mourovets@mail.ru.

Lentsman Mikhail V. – MD, PhD, senior research scientists, Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, e-mail: mlensman@yandex.ru.