

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 615.21+577.15+612.814

Способность пролином богатого полипептида-1 предотвращать морфологические сдвиги и нарушения памяти, вызванные локальной ишемией мозга крыс**А.В.Топчян¹, А.А. Галоян², М.Г. Баласанян¹,
Э.Л.Ерицян¹, А.Г. Мхитарян¹, И. Б. Меликсетян³**¹ Ереванский государственный медицинский университет им. М. Герацци² Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА³ Институт физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА
0025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: ПБП-1, окклюзия левой средней мозговой артерии, нейропротекция

Инсульт является второй по значимости причиной смертности и длительной инвалидизации населения во всем мире, при этом преобладающим считается ишемический тип, из-за которого в США ежегодно регистрируется 160 000 смертей [16,17]. По данным Всемирной организации здравоохранения (2008), каждый год инсульт уносит 5.8 миллионов жизней.

Многие препараты, действие которых направлено на защиту ишемизированной ткани, показали отличные результаты при доклинических испытаниях, ограничивали размер инфаркта, продлевая временное окно для реперфузионной терапии, или сводили к минимуму постишемические реперфузионные повреждения и воспаления, однако полученные результаты оказались неэффективными на стадии клинических испытаний [19]. Очевидно, что изыскание альтернативных путей по восстановлению поврежденных, а также защите неповрежденных нейронов является предметом исследований, а поиск новых соединений для эффективного лечения инсульта в последние годы остается актуальной задачей [15].

Новое семейство пролином богатых полипептидов (ПБП), содержащих 10-15 аминокислот с четырьмя остатками пролина [5,11], вырабатывается NPV и NSO клетками гипоталамуса. Они обладают сильным антибактериальным *in vivo* и противовирусным *in vitro* свойствами [6]. ПБП в связи с их нейропротекторными [7] и иммуностропными свойствами [8,9] также способны предотвращать нейродегенеративные, иммунодефи-

цитные расстройства [9] и обладают способностью влиять на опухолевые клетки [10].

Как было показано в ряде исследований, один из этих богатых пролином пептидов – ПБП-1, содержащий 15 аминокислотных остатков (AGAPERAEPARGVY), обладает широким спектром действия. Была показана также и эффективность ПБП-1 в коррекции цереброваскулярных расстройств [2]. Все вышеописанное послужило основой для исследования способности ПБП-1 предотвращать структурные повреждения тканей головного мозга при локальной ишемии, вызванной окклюзией левой средней мозговой артерии (ОЛСМА).

Материал и методы

В опытах использовались белые беспородные крысы–самцы массой 180-240 г. Все эксперименты осуществлялись согласно нормативам, установленным в статье *The PHS Guide for the Care and Use of laboratory Animals* (1996 г).

Животные содержались в условиях лабораторного вивария (в стандартных клетках не более 6 крыс) при контролируемой температуре ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажности (40-70%). Световой цикл в комнатах был стандартным – 12 ч освещения и 12 ч темноты. Вода для питья и пища для крыс (Teklad rat chow) были доступны *ad libitum*. Животные акклиматизировались в течение 1 недели до эксперимента.

Окклюзия левой средней мозговой артерии. Исследования проводились на крысах под общей анестезией хлоралгидратом (400мг/кг, внутривенно). Для этого животных помещали в специально сконструированную установку, которая позволяла удобно и жестко фиксировать голову в боковом положении, левой стороной вверх. Операцию проводили с помощью нейрохирургической бинокулярной лупы с оптоволоконным осветителем (ЛБВО) фирмы “ЛОМО” (Санкт-Петербург). После удаления шерстного покрова и обработки операционного поля производили разрез кожи по ходу скуловой кости (около 1.5см). Затем расширяли раневую поверхность ранорасширителем и обнажали слюнную железу, расположенную в задненижнем квадрате операционного поля.

С помощью микрохирургических инструментов слюнную железу вместе с сосудистым сплетением аккуратно отделяли от окружающих тканей и перемещали в задневерхний квадрат с ее последующей иммобилизацией. После удаления скуловой кости раскрывались края крепления височной мышцы к нижней челюсти и с помощью бормашины производился щадящий разрез кости по краю крепления к ней сухожилия указанной мышцы. Далее, поднимая с помощью крючков нижний край височной мышцы вверх, обнажали височную ямку, дно которой образует крыловидная мышца с проходящим рядом нижнечелюстным нервом. С по-

мощью специально сконструированного ранорасширителя раздвигали крыловидную мышцу, вследствие чего открывалась поверхность черепа между овальным отверстием и отверстием зрительного нерва. В этой области, а именно, под нижним краем височно-челюстного сустава, сверлили отверстие диаметром около двух миллиметров и обнажали место расположения средней мозговой артерии.

Дальнейшую операцию по перевязке указанной артерии проводили под микроскопом (ОГМЭ-ПЗ) с большим фокусным расстоянием ($f=190\text{мм}$) под большим увеличением ($14,0\times 3,3$). Под левую среднюю мозговую артерию подводили иглу с этиконовой нитью толщиной 10/0 (Ethicon Ltd.), прокалывая иглой твердую мозговую оболочку. Следует отметить, что, в отличие от метода А. Tamura et al. [21], использовали модифицированный метод по А.В. Топчяну [23]: твердую мозговую оболочку не удаляли, а вместе с ней перевязывали среднюю мозговую артерию, кроме того, по методу А. Tamura et al. [21], перевязывали среднюю мозговую артерию дистальнее первой ветви, отходящей от средней мозговой артерии. Для того чтобы увеличить зону ишемического поражения мозга, в наших опытах перевязку средней мозговой артерии проводили у ее основания. После перевязки ток крови по средней мозговой артерии прекращался, что можно было наблюдать в поле зрения под микроскопом.

После завершения операции височные мышцы и кожу пришивали. Животные, перенесшие ОЛСМА, были разделены на 4 группы: животным I группы вводили ПБП-1 в течение 6 дней (два раза в день в дозе 20мкг/кг , в/б), крысам II группы вводили изотонический раствор в течение 6 дней (два раза в день, в/б), животным III группы вводили ПБП-1 в течение 12 дней (два раза в день в дозе 20мкг/кг , в/б), животным IV группы вводили изотонический раствор в течение 12 дней (два раза в день, в/б).

Гистологическое исследование. После обезглавливания животных мозг фиксировали в 200 мл 10% нейтрального буферного формалина и держали в этом фиксаторе минимум 3 дня до их обработки. Полушария были вырезаны и обработаны парафином. Срезы толщиной 6-7 мкм окрашивали по Ниссля [18] и изучали под световым микроскопом. Морфологическое исследование было проведено также по методу Ниссля.

Тест условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Оценку когнитивных функций у животных проводили перед ОЛСМА путем выработки УРПИ [3,14]. Экспериментальная камера для выработки УРПИ состояла из 2 отделений – большего, освещенного, размером $400\times 400\times 300\text{ мм}$, и меньшего, затемненного, размером $100\times 100\times 200\text{ мм}$, с электропроводным полом. Крысу помещали на освещенную платформу перед входом в темную камеру установки, хвостом к входному отверстию. Для оценки рефлекса регистрировали латентное время (ЛВ) первого захода в темную камеру. Найдя отверстие в перегородке, крыса переходила из освещенного отделения в затемненное. В течение 300 сек регистрировалось время

первого захода в темный отсек. В момент, когда крыса находилась в затемненном отделении, закрывалась шторка и ей через вмонтированные в пол электроды наносили электробовое раздражение напряжением до 40В и силой тока до 1А в течение 10 сек. Потом её удаляли из камеры и возвращали в клетку. Животное запоминало, что в темную камеру заходить опасно. Через 24 часа проверяли воспроизведение рефлекса у каждого животного. Выработанным рефлекс считался в том случае, если в течение всех 300 сек наблюдения животное не совершало перехода из светлого отсека в темный.

На следующий день, после формирования устойчивого рефлекса, крыс снова помещали на платформу и измеряли латентный период (ЛП), время нахождения в светлом и темном отсеках в течение 300 сек. При наличии положительного результата (если животное не входило в темный отсек в течение 300 сек) на следующий день крыса подвергалась ОЛСМА, а животные, не проявившие положительный результат, были изъяты из эксперимента. После операции животные были разделены на две группы: крысы, подвергнутые ОЛСМА и получающие 0.9% раствор NaCl (контрольная группа), и оперированные животные, которым два раза в день в дозе 20мкг/кг вводили ПБП-1 (опытная группа). Тест на воспроизведение УРПИ (на сохранение памятного следа) осуществляли также на 3, 6 и 12-е сутки после операции. Животное вновь помещали на освещенную платформу и регистрировали ЛВ первого захода и ЛП.

Статистический анализ. Все данные выражены с использованием стандартных отклонений ($M \pm m$). Статистический анализ проведен с использованием Microsoft Excel 2007. Множественные сравнения выражены с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались существенными при $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

Результаты морфологического исследования коры мозга крыс выявили поражения нервной ткани, затрагивающие, прежде всего, нервные клетки, их отростки, а также окружающие глиальные элементы. Результаты наших данных показывают, что через 6 дней после ОЛСМА в коре головного мозга не отмечается четкого цитоархитектонического разграничения слоев. Наблюдается уменьшение плотности расположения нейронов, у большинства из них отростки не реагируют, нейроны выглядят округлыми (рис. 1 А,а,С,Д). Поражение нейронов идет по типу центрального хроматолиза. В цитоплазме большинства набухших нейронов происходит постепенное исчезновение тигроида. В итоге создается картина клеточной тени или полного исчезновения, что приводит к диффузному или ограниченному разрежению клеточных слоев, пространства которых остаются незаполненными вследствие отсутствия реакции ядер глиальных

клеток. Ядра клеток, находящихся в стадии набухания, также оказываются вздутыми, окружены темным кольцом зерен осадка, более интенсивно накопившегося в области отхождения апикального дендрита. Нельзя сказать, что хроматолиз является доминирующим состоянием. Часто обнаруживается контраст между интенсивностью хроматолиза и структуральным состоянием сохранившихся нейронов, что, вероятно, свидетельствует о резистентности нервной клетки. У большинства крупных пирамидных клеток светлые ядра имеют центральное расположение, четко прослеживаются вершечные дендриты. Сходная картина характерна и при 12-дневной ОЛСМА. При этом также наблюдается процесс “исчезновения клеток”, однако здесь количество и объем “выпадения нейронов” несколько больше, в сравнении с 6-дневным сроком (рис. 1 В,Е). Морфологическая картина напоминает острое набухание нервных клеток, которое относится к довольно распространенному виду клеточной патологии. Морфологическая картина является выражением ответной реакции на различные патологические воздействия экзо- и эндогенного происхождения и присуща неспецифическим нейрональным поражениям.

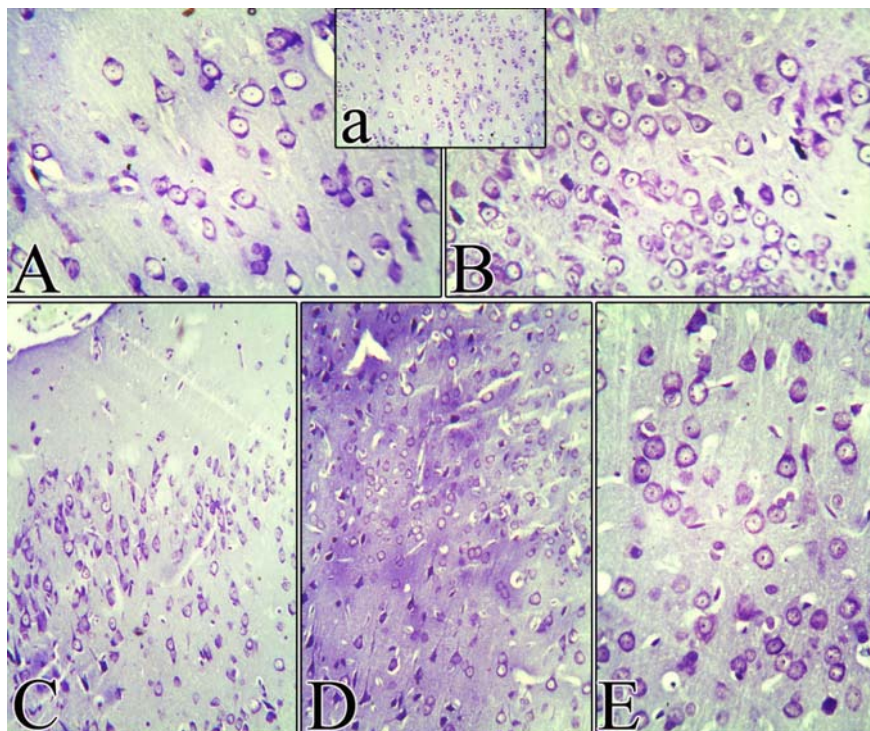


Рис.1. Нейроны коры головного мозга крыс, подвергнутых ОЛСМА и получавших 0.9% раствор NaCl (контрольная группа), на 6-й (А, а, С, D) и 12-й (В, Е) дни.

Центральный хроматолиз с выраженной вакуолизацией ядра и с одним центрально расположенным ядрышком. Interaural 6,7 мм. Bregma 2,3 мм. Зона S₁.
Увеличение: ок. 10, об. 20 (А, а, С, D); 40 (А, В, Е)

У крыс, получивших ПБП-1 после 6-дневной ОЛСМА, “выпадение нейронов” в клеточной реакции коры больших полушарий мозга не наблюдается (рис. 2 А); увеличена плотность расположения нейронов.

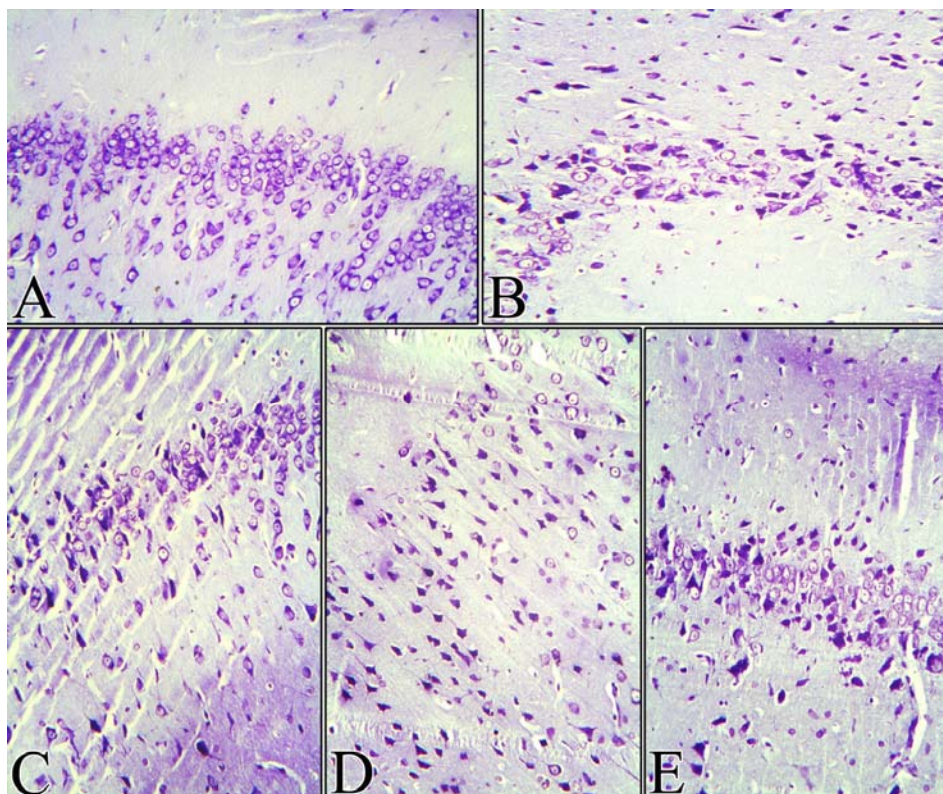


Рис. 2. Нейроны коры головного мозга крыс, подвергнутых ОЛСМА и получавших ПБП-1 два раза в день в дозе 20мкг/кг, на 6-й день. Описывается заметное восстановление внутрицитоплазматического пигмента. Выявляются нейроны с темной цитоплазмой и хорошо различимым аксоном. Interaural 6,7 мм. Bregma 2,3 мм. Зона S₁.

Увеличение: ок. 10, об. 20 (А – Е)

После введения ПБП-1 в коре мозга у всех пирамидных нейронов начинают реагировать утолщенные апикальные дендриты (рис. 2 D,E). На срезах наблюдается разница в интенсивности окрашивания клеток, а именно, встречаются как темноокрашенные клетки, так и нейроны с явлением хроматолиза (рис. 2 А,B,C).

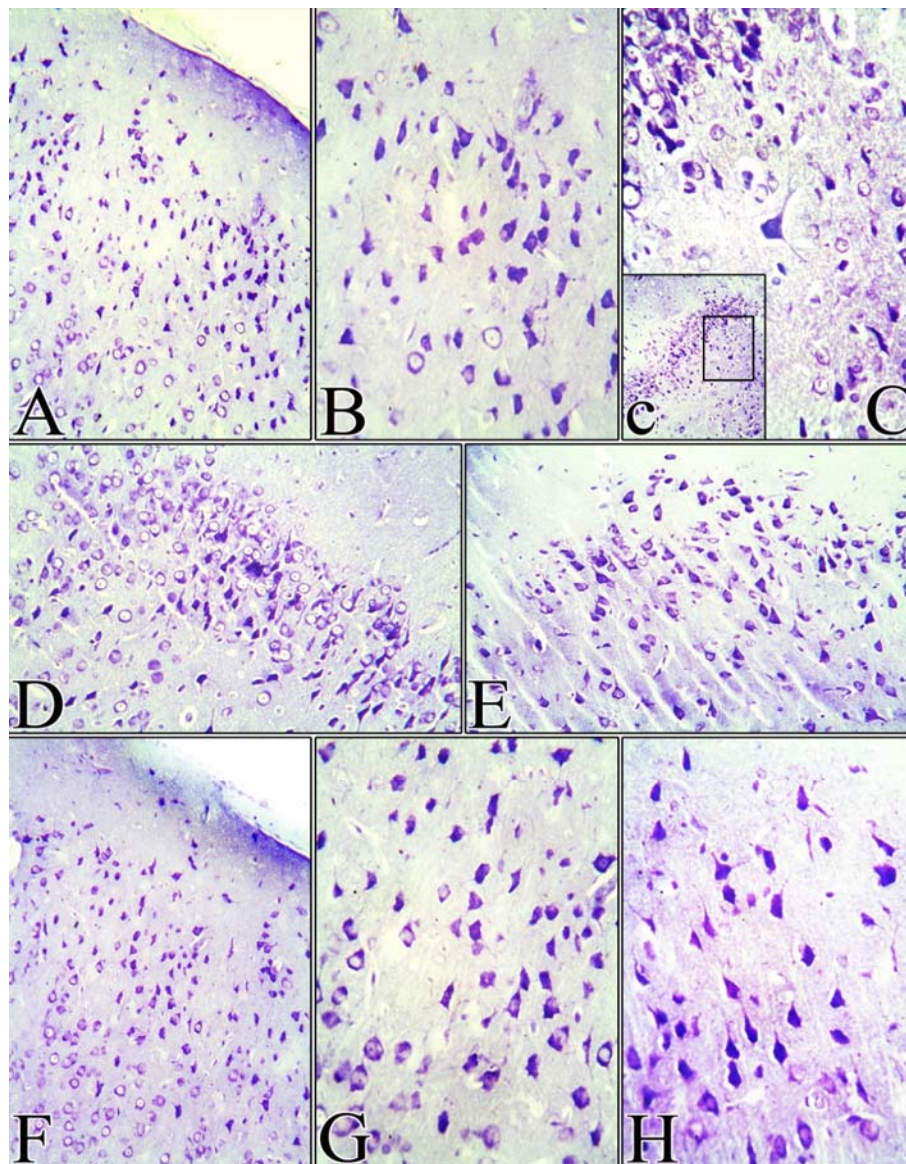


Рис.3. Нейроны коры головного мозга крыс, подвергнутых ОЛСМА и получавших ПБП-1 два раза в день в дозе 20мкг/кг, на 12-й день. Выраженное, местами полное восстановление интрацитоплазматического пигмента нейронов.

Interaural 6,7 мм. Bregma 2,3 мм. Зона S₁.

Увеличение: ок. 10, об. 20 (A, с, D- F); 40 (B, C, G, H)

(C – фрагмент с в прямоугольнике)

Через 12 дней после введения ПБП-1 наблюдается аналогичная картина, морфологически отмечается выраженное понижение хроматолиза. Восстанавливаются размеры и форма большинства пирамидных клеток

(рис. 3A,B,C,D,E,F,G,H), также наблюдается выраженное, местами полное восстановление интрацитоплазматического пигмента нейронов. В дальнейшем, с развитием восстановительных процессов, размеры нейронов снижаются, ядро переходит в центр клетки и цитоплазма заполняется гранулами тигроида. Выявляются не только верхушечные дендриты, но и боковые ветвления. Клетки выглядят несколько темными, что характерно для нейронов, находящихся на стадии восстановления.

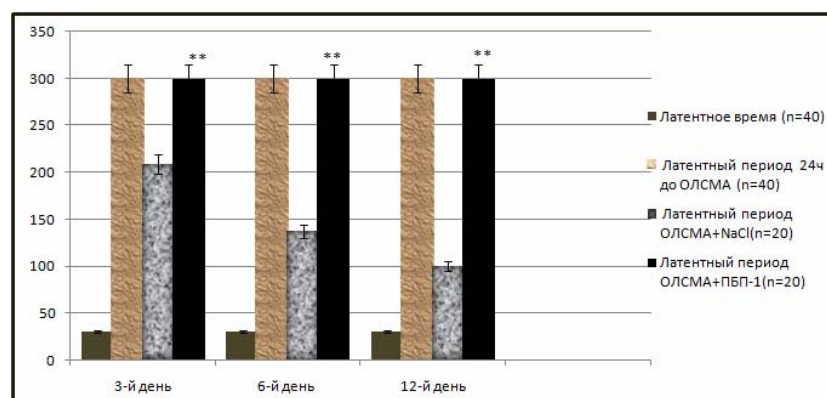


Рис. 4. Влияние ПБП-1 на латентный период в тесте УРПИ на 3, 6, и 12-й дни после ОЛСМА. Латентный период в тесте пассивного избегания в различные интервалы времени у крыс, подвергшихся ОЛСМА. Достоверное различие: *р по сравнению с ОЛСМА + 0.9% NaCl, **р < 0,01

При исследовании влияния ПБП-1 на процессы обучения и памяти была выявлена способность исследуемого пептида предотвращать вызванные ишемией нарушения отмеченных показателей. Так, в тесте УРПИ (рис. 4) до электрической стимуляции ЛВ равнялось ($29,6 \pm 0,7$) сек. После получения электрической стимуляции было зарегистрировано значение ЛП равное $299,6 \pm 0,7$ ($F_{(1;77)}=2704412$, $P<0,01$) сек, свидетельствующее о формировании рефлекса. После ОЛСМА на 3, 6 и 12-й дни у опытной группы крыс, получавших 0.9% NaCl, ЛП был снижен до $208,3 \pm 48,3$ ($F_{(1;59)}=145$, $P<0.01$), $137,2 \pm 40,9$ ($F_{(1;59)}=642$, $P<0.01$) и $100,5 \pm 23,6$ ($F_{(1;59)}=2903$, $P<0.01$) сек соответственно. При воспроизведении УРПИ на фоне введения ПБП-1 было установлено, что препарат полностью предотвращает нарушение памяти и обучения во все исследуемые сроки ишемии.

Результаты исследований по применению ПБП-1 при локальной ишемии у крыс показали, что он способствует выживанию клеток и нейропротекции. Как известно, некоторые области мозга, включая гиппокамп, являются более уязвимыми к ишемии, чем другие. При этом, как правило, интернейроны гиппокампа более устойчивы к эксайтотоксичности инсульта, чем пирамидальные клетки [19]. В этом плане особого внимания заслуживает способность ПБП-1 заметно регенерировать сами пирами-

дальние клетки, что проявлялось переходом ядра в центр клетки, наполнением цитоплазмы гранулами, одновременно наблюдались боковые ветвления дендритов.

Нейропротективная способность ПБП-1 в исследованной нами экспериментальной модели ишемического инсульта может быть обоснована рядом ранее полученных данных.

Так, была показана антирадикальная активность и антиоксидантная способность ПБП-1 [22]. Между тем хорошо известно, что накопление свободных радикалов кислорода является одним из важных патогенетических механизмов ишемического некроза [2].

Кроме того, ПБП-1 является одним из нейротрофических факторов мозга, обладает иммуномодулирующим действием [8,9]. А при инсульте в условиях церебральной реперфузионной ишемии стимулируется воспалительный каскад, характеризующийся активацией, миграцией и аккумуляцией иммунных клеток и оказывающий значительное влияние на вторичное повреждение мозга, приводя к цитотоксической гибели нейронов [20].

Немаловажным является и то, что ПБП-1 является уникальным регулятором активности каспаз, которые играют важную роль в молекулярных механизмах выживаемости нейронов [4].

Наконец, было показано, что ПБП-1 способен защитить нейроны мозга при алюминиевом нейротоксикозе [12], а также была показана его нейропротекторная роль на модели болезни Альцгеймера, вызываемой A β 25-35 [13].

Изучение влияния ПБП-1 на обучение и память после ОЛСМА было продиктовано тем, что одним из важных последствий инсульта является нарушение когнитивных способностей. Существует доказательство того, что когнитивные нарушения более продолжительны, чем общий сенсомоторный дефицит [3,14], который проявляется в хронических поведенческих тестах. Принимая во внимание, что одним из наиболее удобных и широко используемых методов при изучении влияния различных веществ на когнитивные процессы в эксперименте на грызунах является воспроизведение памятного следа после выработки УРПИ, способность ПБП-1 сохранять когнитивные функции и память была оценена с применением указанного теста. Результаты проведенных исследований показали, что вызванный локальной ишемией долговременный дефицит памяти и обучения может быть устранен при систематическом введении ПБП-1.

Таким образом, описанные ранее нейропротективные свойства ПБП-1 при нейродегенеративных патологиях головного и спинного мозга [7] и его способность улучшать кровоснабжение ишемизированного мозга [1] вместе с представленными нами данными о положительных изменениях структуры нейронов, ведущих к выживанию клетки, и способность исследуемого нейропептида сохранять когнитивные функции при локально

ишемических поражениях мозга открывают новые перспективы для дальнейшего исследования ПБП-1 в качестве потенциального нейропротекторного средства при ишемическом инсульте.

Поступила 089.05.14

Ուղեղի լոկալ իշեմիայով պայմանավորված մորֆոլոգիական տեղաշարժերի և հիշողության խանգարման կանխումը հիպոթալամիկ պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդ-1-ով

Հ.Վ. Թոփչյան, Ա.Ա. Գալոյան, Մ.Գ. Բալասանյան, Է.Լ. Երիցյան, Ա.Գ. Մխիթարյան, Ի.Բ. Մելիքսեթյան

Ուսումնասիրված է խոշոր եղջրավոր անասունների նեյրոհիպոֆիզի նեյրոսեկրետոր կորիզներից անջատված հիպոթալամիկ պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդ-1-ի (ՊՀՊ-1) նեյրոպրոտեկտիվ ազդեցությունը առնետների միջին ուղեղային զարկերակի կապումով (ՄՈւԶԿ) պայմանավորված ուղեղի լոկալ իշեմիկ խանգարումների ժամանակ:

Ուղեղի կտրվածքների մորֆոլոգիական հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ ՊՀՊ-1-ի 20 մկգ/կգ դեղաչափով 6- և հատկապես 12-օրյա ն/ո ներարկումները կանխում են ուղեղի տարբեր կառուցվածքներում իշեմիայի հետևանքով զարգացող մորֆոլոգիական փոփոխությունները՝ նպաստելով նեյրոնների պահպանմանը: Միաժամանակ, նշված ժամանակահատվածի ընթացքում ՊՀՊ-1-ի ներարկումը նպաստում է կենդանիների հիշողության պահպանմանը *պասիվ խուսափման պայմանական ռեֆլեքս* թեստում:

Prevention of morphological changes and memory impairment induced by local cerebral ischemia in rats by proline-rich polypeptide-1

H.V. Topchyan, A.A. Galoyan, M.G. Balasanyan, E.L. Yeritsyan, A.G. Mkhitaryan, I.B. Meliksetyan

The neuroprotective effect of hypothalamic proline-rich polipeptide-1 (PRP-1) obtained from neurosecretory granules of bovine neurohypophysis was investigated under condition of local ischemic disturbances induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Rats' brain stained sections' morphological imaging has indicated that i/p administration of PRP-1 in the

dose of 20 µg/kg after 6 and especially 12 days of MCAO prevents morphological changes of different brain structures leading to neuronal surviving. Simultaneously, administration of PRP-1 in the mentioned ischemic period leads to significant prevention of rat's memory loss in *passive avoidance test*.

Литература

1. Balasanyan M.G., Yeritsyan E.L., Topchyan A.V., Karamyan S.T., Galoyan A.A. The cerebrovascular effects of PRP-1. *Neurochemical Journal*, 2012, 6, 3, p. 173-178.
2. Bigdeli M.R. Neuroprotection caused by hyperoxia preconditioning in animal stroke models. *The Scientific World Journal*, 2011, 11, p. 403-421.
3. Cumin R., Bandle E.F., Gamzu E., Haefely W.E. Effects of the novel compound aniracetam (Ro 13-5057) upon impaired learning and memory in rodents. *Psychopharmacology*, 1982, 78, p. 104-111.
4. Fudong Liu., Zhong Li., Jun Li., Chad Siegel., Rongwen Yuan., Louise D., L.D. McCullough Sex differences in caspase activation after stroke. *Stroke*, 2009, 40, 5, p. 1842-1848.
5. Galoyan A.A. Biochemistry of novel cardioactive hormones and immunomodulators of the functional system neurosecretory hypothalamus-Endocrine Heart. Nauka Publishers, Moscow, 1997.
6. Galoyan A.A., Grigoryan S.L., Badalyan K.V. Treatment and prophylaxis of anthrax by new neurosecretory cytokines. *Neurochem. Res.*, 2006, 31, 6, p. 795-803.
7. Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Chavushyan V.A., Sulkhanyan R.M., et al. Neuroprotective action of hypothalamic peptide PRP-1 at various time survivals following spinal cord hemisection. *Neurochem. Res.*, 2005, 30, 4, p. 507-525.
8. Galoyan A.A. Neurochemistry of brain neuroendocrine immune system: signal molecules. *Neurochem. Res.*, 2000, 25, 9-10, p. 1343-1355.
9. Galoyan A.A., Aprikyan V.S. A new hypothalamic polypeptide is a regulator of myelopoiesis. *Neurochem. Res.*, 2002, 27, 4, p. 305-312.
10. Galoyan A.A., Shakhlov V.A., Malaytsev V.V. Changes in tumor cells L929 under PRP effect in vitro. *Med. Sci. Armenia*, 2001, 41, 1, p. 25-29.
11. Galoyan A.A. Brain neurosecretory cytokines: immune response and neuronal survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, 2004.
12. Galoyan A.A., Shakhlov V.A., Aghajanyan M.I., Vahradian H.G. Hypothalamic Proline Rich Polypeptide Protects Brain Neurons in Aluminum Neurotoxicosis. *Neurochem Res.*, 2004, 29, 7, p. 1349-1357.
13. Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Chavushyan V.A., Meliksetyan I.B. et al. Protective effects of novel hypothalamic neuropeptide proline-rich peptide-1 on the hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease induced by β -amyloid A β 25-35. *Alzheimer & Dementia*, 2008, 4, p. 332-344.
14. Iasnetsov V.V., Voronina T.A. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 2009, 72, 1, p. 68-70.
15. Kidwell C.S., Liebeskind D.S., Starkman S., Saver J.L. Trends in acute ischemic stroke trials through the 20th century. *Stroke*, 2001, 32, 6, p. 1349-1359.
16. Lloyd-Jones D., Adams R.J., Brown T.M. et al. Heart disease and stroke statistics-2010: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2010, 121, p. e46-e215.
17. Martinez-Vila E., Sierra P.I. *Cerebrovasc. Dis.*, 2011, Suppl. 1, p. 60-70.
18. Merkulov G.A. Курс патогистологической техники. Л., "Медицина", 1969.
19. Nikonenko A.G., Radenovic I.L., Andjus P.R., Skibo I.G.G. Structural Features of Ischemic Damage in the Hippocampus. *J. of the Anatomical Records*, 2009, 292, 12, p. 1914-1921.

20. *Stoll G., Kleinschnitz C., Nieswandt B.* Combating innate inflammation: a new paradigm for acute treatment of stroke? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2010, 1207, p. 149–154.
21. *Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale M.G.* Focal Cerebral Ischemia in Rat: 1. Description of Technique and Early Neuropathological Consequences Following Middle Cerebral Artery Occlusion. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1981, 1, 1, p. 53-60.
22. *Tavadyan L.A., Galoian K.A., Harutunyan L.A., Tonikyan H.G., Galoyan A.A.* Antioxidant and electron donating function of hypothalamic polypeptides: galarmin and Gx-NH₂. *Neurochem. Res.*, 2010, 35, 6, p. 947-952.
23. *Topchian A.V., Mirzoian R.S., Balasanian M.G.* Local cerebral ischemia in rats induced by ligation of the middle cerebral artery. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 1996, 59, 5, p. 62-64.