

doi : 10.52485/19986173_2021_1_59

УДК: 616.8-085.2/3 616-005.8

Поздняков Д.И.

ПРИМЕНЕНИЕ 4-ГИРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТБУТИЛ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ УМЕНЬШАЕТ ИНТЕНСИВНОСТЬ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ У КРЫС ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал
ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Россия,
Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11*

Цель. Оценить влияние 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты на процессы нейровоспаления у крыс в условиях ишемии головного мозга в сравнении с этилметилгидроксипиридинасукцинатом.

Материалы и методы. Ишемию головного мозга воспроизводили у крыс линии Wistar путем необратимой правосторонней коагуляции средней мозговой артерии. Исследуемое соединение – 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричную кислоту и препарат сравнения – этилметилгидроксипиридинасукцинат вводили перорально в дозе 100 мг/кг через 30 минут после моделирования ишемии и далее однократно в сутки на протяжении 3-х дней. На 4-е сутки эксперимента у крыс оценивали степень проницаемости гематоэнцефалического барьера в тесте Майлза. Также изучали изменение цитокинов (ИЛ-6; ИЛ-1β; ИЛ-10 и ФНО-α) и монооксида азота в мозговой ткани у животных. Содержание цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, концентрацию монооксида азота оценивали спектрофотометрически в реакции с реактивом Грисса.

Результаты. В ходе исследования было установлено, что применение исследуемого соединения в дозе 100 мг/кг способствовало уменьшению концентрации провоспалительных цитокинов: ИЛ-6 – на 37,2% ($p < 0,05$); ИЛ-1β – на 42,5% ($p < 0,05$), ФНО-α – на 33,4% ($p < 0,05$). При этом содержание ИЛ-10 увеличилось в 3,1 ($p < 0,05$). Также на фоне введения 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты отмечено уменьшение содержания монооксида азота в мозговой ткани и проницаемости гематоэнцефалического барьера на 33,1% ($p < 0,05$) и 38,2% ($p < 0,05$) соответственно. Необходимо отметить, что эффект от применения исследуемого соединения превосходил аналогичный от введения референтного препарата.

Заключение. 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричная кислота уменьшает интенсивность реакций нейровоспаления, что выражается в уменьшении содержания провоспалительных цитокинов, концентрации монооксида азота и проницаемости гематоэнцефалического барьера, что может лежать в основе нейропротекторного действия данного соединения.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, нейровоспаление, антиоксиданты, производные коричной кислоты.

Pozdnyakov D. I.

USE OF 4-HYDROXY-3,5-DI-TRETBTUTYL CINNAMIC ACID REDUCES THE INTENSITY OF NEUROINFLAMMATION IN RATS WITH CEREBRAL ISCHEMIA

*Pyatigorsk medical and pharmaceutical Institute is a branch of the Volgograd state medical University,
11 Kalinina Ave., Pyatigorsk, Stavropol region, Russia, 357532*

The aim of the research. To evaluate the effect of 4-hydroxy-3,5-di-tretbutyl cinnamic acid on neuroinflammation in rats with cerebral ischemia in comparison with ethylmethylhydroxypyridine succinate.

Materials and Methods. Brain ischemia was reproduced in Wistar rats by irreversible right-sided coagulation of the middle cerebral artery. The test-compound-4-hydroxy-3,5-di-tretbutyl cinnamic acid and the reference drug-ethylmethylhydroxypyridine succinate were administered orally at a dose of 100 mg / kg 30 minutes after the ischemia modeling and then once a day for 3 days. On the 4th day of the experiment, the degree of permeability of the blood-brain barrier in the Miles test was evaluated. Changes in cytokines (IL-6; IL-1β; IL-10 and TNF-α) and nitrogen monoxide in brain tissue in animals were also studied. The content of cytokines was determined by enzyme-linked immunoassay, and the concentration of nitrogen monoxide was evaluated spectrophotometrically in reaction with the Griss reagent.

Results. During the study, it was found that the use of the test compound at a dose of 100 mg / kg contributed to a decrease in the concentration of pro-inflammatory cytokines: IL – 6-by 37.2% ($p<0.05$); IL – 1 β -by 42.5% ($p<0.05$), TNF – α - by 33.4% ($p<0.05$). At the same time, the content of IL-10 increased by 3.1 ($p<0.05$). Also, against the background of the administration of 4-hydroxy-3,5-di-tertbutyl cinnamic acid, there was a decrease in the content of nitrogen monoxide in brain tissue and the permeability of the blood-brain barrier by 33.1% ($p<0.05$) and 38.2% ($p<0.05$), respectively. It should be noted that the effect of the test compound was superior to that of the reference drug.

Conclusion. 4-hydroxy-3,5-di-tertbutyl cinnamic acid reduces the intensity of neuroinflammatory reactions, which is expressed in a decrease in the content of pro-inflammatory cytokines, the concentration of nitrogen monoxide and the permeability of the blood-brain barrier, which may underlie the neuroprotective effect of this compound.

Key words: brain ischemia, neuroinflammation, antioxidants, cinnamic acid derivatives.

В общемировом масштабе ишемический инсульт является второй неинфекционной причиной смертности и ведущей причиной первичной инвалидности населения. Ежегодно регистрируется более 15 млн случаев ишемического инсульта, из которых 5 млн – летальны [1]. По разным подсчетам каждый год в силу инвалидности после инсульта из активной трудовой деятельности выбывают от 46% до 67% населения. Во многом высокая эпидемиологическая значимость ишемического инсульта опосредована наличием большого числа факторов риска и сложностью патогенеза заболевания [2].

Патогенез ишемического инсульта представляет собой комплекс патофизиологических реакций, происходящих в основном в области «ишемической пенумбры», приводящих к нарушению структурно-функциональной целостности нейронов и увеличению зоны некротического очага. Недавние исследования показали, что одним из значимых элементов «ишемического каскада» является индукция нейровоспаления (рисунок 1) [3]. Нейровоспаление определяется как реакция воспаления, протекающая в головном мозге, опосредованная активацией микроглии, с гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, хемокинов, активных форм кислорода и вторичных мессенджеров [4]. Активация микроглии происходит непосредственно сразу после прекращения тока крови в «ишемическом ядре» и контролируется индуцибельной синтазой оксида азота (iNOS), через CD14 и толл-подобные рецепторы 4 (TLR4) с вовлечением в процесс поражения близлежащих тканей [5]. При этом повреждающее действие активированных клеток микроглии опосредовано цитокинами, запускающими вторичный каскад повреждения нейронов. Так, гиперпродукция фактора некроза опухоли – α (ФНО- α) приводит к повышению внутриклеточной концентрации глутамата (блокирует транспортер глутамата EEAT2), усиливает кальциевую цитотоксичность, стимулирует апоптоз эндотелиальных клеток и первичную лейкоцитарную миграцию, усиливает глиоз и повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [6]. Интерлейкин 1- β (ИЛ-1 β) действует как эндогенный пироген, в значительной степени повышает активность матриксной металлопротеиназы 9, что усиливает адгезию лейкоцитов к эндотелию и усугубляет повреждение ГЭБ [7]. Интерлейкин 6 (ИЛ-6) стимулирует миграцию лейкоцитов в очаг «ишемической полутени» [8].

В то же время, увеличение синтеза провоспалительных цитокинов сопровождается уменьшением продукции противовоспалительного интерлейкина 10 (ИЛ-10). Также активированные клетки микроглии продуцируют большое количество оксида азота, что в совокупности с повышением активности iNOS приводит к образованию нейротоксичного пероксонитрита [9]. Кроме того, вовремя ишемии цитокины глиальных клеток приводят к гиперплазии астроцитов. В свою очередь пролиферация астроцитов приводит к экспрессии воспалительных факторов, таких как хемотаксический белок моноцитов-1, IL-1 β , глиальный фибриллярный кислый белок, что может приводить к реактивному глиозу и образованию рубцов. Реактивные астроциты, подобно глиальным клеткам, экспрессируют матриксные металлопротеиназы, повреждающие ГЭБ [10]. Важно отметить, что микроглиальная и астроцитарная нейротоксичность, вызванная увеличением концентрации цитокинов, усиливается при повышении активности НАДФ-оксидаз, увеличении концентрации

глутамата и внутриклеточного кальция, что определяет тесную взаимосвязь нейровоспаления с остальными элементами «ишемического каскада», такими как, глутаматно-кальциевая эксайтотоксичность, окислительный стресс, апоптоз, энергодефицит и эндотелиальная дисфункция [11].

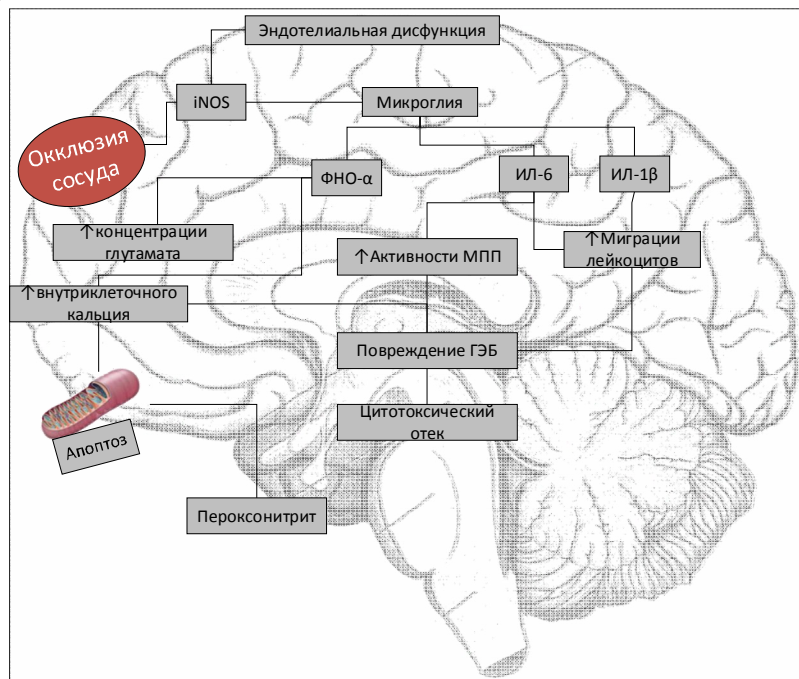


Рис. 1. Патогенетические пути повреждения головного мозга при развитии нейровоспаления.

Подавление нейровоспаления может являться перспективным направлением нейропротекции при ишемическом инсульте. При этом уменьшение интенсивности глиальных реакций может быть достигнуто путем применения экзогенных антиоксидантов. Работа, проведенная *Yuan, et.al. 2014* показала, что введение животным с ишемией головного мозга скутелларина и эдаравона – соединений, способных повышать активность глутатионпероксидазы, препятствовало гиперпродукции цитокинов клетками глии [12].

Аналогичные результаты были получены *DuanJ, et.al. 2019*, которые установили, что введение антиоксиданта аппелина 13 значительно уменьшает интенсивность нейровоспаления у ишемизированных животных [13]. Ранее было установлено, что 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричная кислота обладает выраженной антиоксидантной и нейротропной активностью, что делает данное соединение перспективным корректором воспалительных реакций нервной ткани [14].

Цель работы состояла в оценке влияния 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты на процессы нейровоспаления у крыс в условиях ишемии головного мозга.

Материалы и методы. Работа выполнена на 80 крысах-самцах линии Wistar массой 180-220 граммов. Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» и 14 дней содержались в карантинных условиях. Во время эксперимента крысы содержались в стандартных условиях с соблюдением требований Директивы 2010/63 / Европейского парламента для защиты животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 года при температуре окружающего воздуха $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, относительной влажности $60 \pm 5\%$ и естественной смене суточного цикла. Ишемию головного мозга моделировали у наркотизированных хлоралгидратом животных (интраперитонеально, 350 мг/кг) по методу *Tamura* [14], путем необратимой правосторонней термокоагуляции средней мозговой артерии. Крыс рандомизировали на 4 равные группы по 20 особей в каждой: ложнооперированные крысы (ЛО) – к данной группе животных применялись все последовательные операции за исключением коагуляции артерии; негативный контроль (НК) – группа животных с воспроизведённой ишемией, но лишённая фармакологической

поддержки (данной группе вводили воду очищенную в эквивалентном объеме); группа крыс, получавшая препарат сравнения; группа животных, которой вводили исследуемое соединение. В качестве референтного препарата использовали этилметилгидроксипиридина сукцинат («Мексидол», ФАРМАСОФТ, РФ) в дозе 100 мг/кг, который вводили *per os* через атравматичный зонд спустя 30 мин. после моделирования ишемии и далее на протяжении 3-х дней (однократно в сутки). 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричную кислоту (лабораторный шифр АТАСЛ) вводили в дозе 100 мг/кг по схеме аналогичной препарату сравнения [14]. На 4-е сутки с момента операции 10 крыс из группы декапитировали (под хлоралгидратной анестезией) и извлекали головной мозг, который использовали в качестве биоматериала. У 10 оставшихся животных в группе оценивали изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера. Головной мозг крыс гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере (рН=7,4), полученный гомогенат центрифугировали при 10 000 RPM в течение 10 минут. В полученном супернатанте определяли изменение содержания цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО- α) и монооксида азота (NO). Концентрацию цитокинов оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением видоспецифичного набора реактивов производства компании *Cloudclone* (США, Хьюстон). Содержание NO определяли спектрофотометрически в непрямой реакции образующихся нитритов с реактивом Грисса при длине волны 550 нм. Концентрацию монооксида азота выражали в ммоль на мг белка, содержание которого оценивали по методу Брэдфорда. Проницаемость гематоэнцефалического барьера определяли методом Майлза, основанном на эстравазации синего Эванса в поврежденных участках ГЭБ. Краситель вводили наркотизированным крысам в хвостовую вену в виде 0,5% раствора в объеме 0,2 мл. После 30 минут экспозиции животных декапитировали и извлекали головной мозг, который гомогенизировали в формамиде в соотношении 1:7. Полученный гомогенат инкубировали при 55⁰С в течение 24 часов и далее центрифугировали при 1000g 5 минут. Регистрировали оптическую плотность полученного супернатанта. Концентрацию синего Эванса определяли по стандартной кривой, и выражали в нг/мг ткани [15]. Статистический анализ полученных результатов осуществляли с применением программного пакета STATISTICA 6.0. Данные выражали в виде $M \pm m$ (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего). Сравнение групп средних производили методом однофакторного дисперсионного анализа с пост-тестом Ньюмена-Кейлса при $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований. В ходе исследования было установлено, что у НК группы животных в сравнении с ЛО крысами отмечено увеличение концентрации ИЛ-6 в 8,4 раза ($p < 0,05$); ИЛ-1 β – в 3,5 раза ($p < 0,05$) при уменьшении содержания ИЛ-10 в супернатанте головного мозга на 84,8% ($p < 0,05$). В тоже время у крыс НК группы концентрация ФНО- α была в 4,1 раза ($p < 0,05$) выше аналогичного показателя ЛО животных (рис.2). Применение референтного препарата этилметилгидроксипиридинасукцината способствовало уменьшению содержания ИЛ-6, ИЛ-1 β и ФНО- α в сравнении с НК группой животных на 28,6% ($p < 0,05$); 19,7% ($p < 0,05$) и 23,0% ($p < 0,05$) соответственно. При этом концентрация ИЛ-10 у крыс, получавших препарат сравнения, была выше таковой у НК группы крыс на 74,1% ($p < 0,05$). У животных, которым вводили исследуемое соединение АТАСЛ, наблюдалось уменьшение (относительно НК группы животных) концентрации ИЛ-6 – на 37,2% ($p < 0,05$); ИЛ-1 β – на 42,5% ($p < 0,05$), ФНО- α – на 33,4% ($p < 0,05$), при увеличении содержания ИЛ-10 в 3,1 ($p < 0,05$). Стоит отметить, что у крыс, получавших АТАСЛ, концентрация ИЛ-1 β была меньше на 28,4% ($p < 0,05$), что сопровождалось увеличением содержания ИЛ-10 на 78,7% ($p < 0,05$).

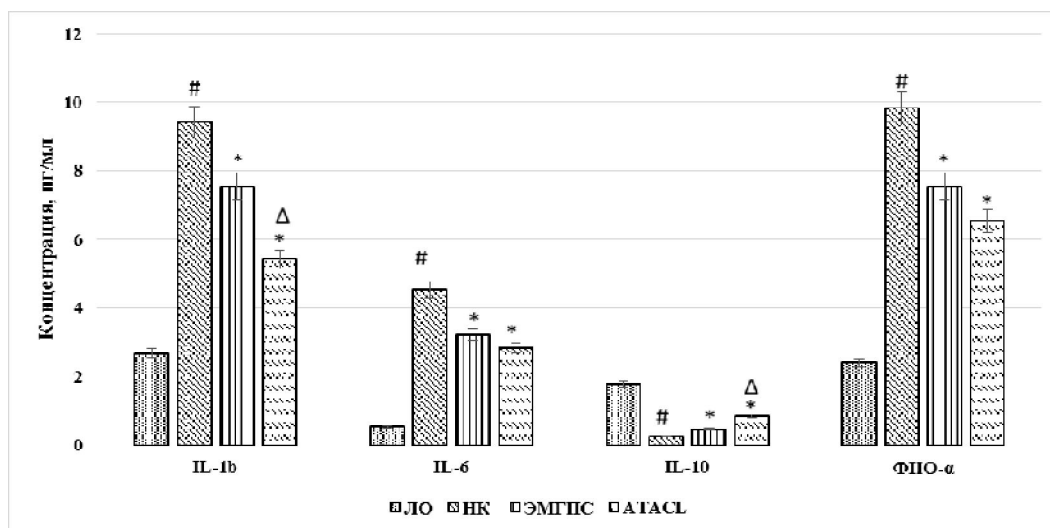


Рис. 2. Изменение концентрации цитокинов в супернатанте головного мозга у ишемизированных животных на фоне введения исследуемого соединения и препарата сравнения.

Примечание: на этом и следующих рисунках: ЛО – ложнооперированные животные, НК – негативный контроль; ЭМГПС – группа животных, получавшая этилметилгидроксипиридина сукцинат; АТАСЛ – группа животных, получавшая исследуемое соединение АТАСЛ; # - статистически значимо относительно ЛО животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$); * - статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$); Δ - статистически значимо относительно животных, получавших этилметилгидроксипиридина сукцинат (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Помимо увеличения уровня провоспалительных цитокинов у НК группы крыс отмечено повышение концентрации монооксида азота в супернатанте головного мозга в 2,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с ЛО животными (рис.3). В то же время на фоне введения этилметилгидроксипиридинасукцината и соединения АТАСЛ содержание NO уменьшилось по отношению к НК группе крыс на 19,2% ($p < 0,05$) и 33,1% ($p < 0,05$) соответственно. Стоит отметить, что у группы животных, получавших АТАСЛ, концентрация монооксида азота была на 17,2% ($p < 0,05$) ниже таковой у группы крыс, которым вводили препарат сравнения.

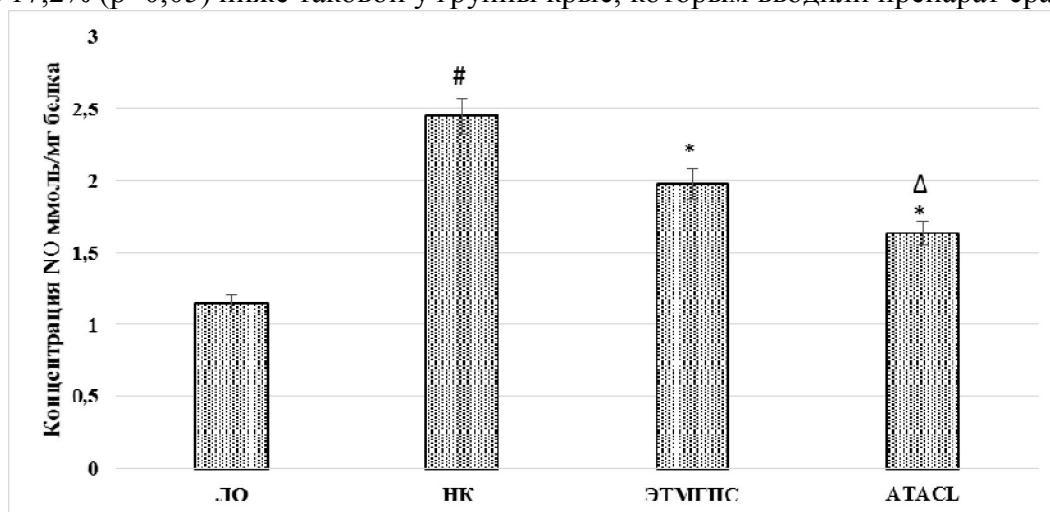


Рис. 3. Изменение концентрации монооксида в супернатанте головного мозга у ишемизированных животных на фоне введения исследуемого соединения и препарата сравнения.

При оценке проницаемости гематоэнцефалического барьера (рис.4) у животных в условиях ишемии головного мозга было установлено, что у НК группы крыс данный показатель превышал аналогичный у ЛО животных в 3,1 раза ($p < 0,05$). При применении этилметилгидроксипиридинасукцината степень проницаемости ГЭБ снизилась по

отношению к НК группы животных на 17,6% ($p < 0,05$). При этом у крыс, которым вводили соединение АТАСЛ, проницаемость ГЭБ была ниже чем у группы животных, лишенных фармакологической поддержки на 38,2% ($p < 0,05$) и на 25,0% ($p < 0,05$) по отношению к группе крыс, получавших референтный препарат.

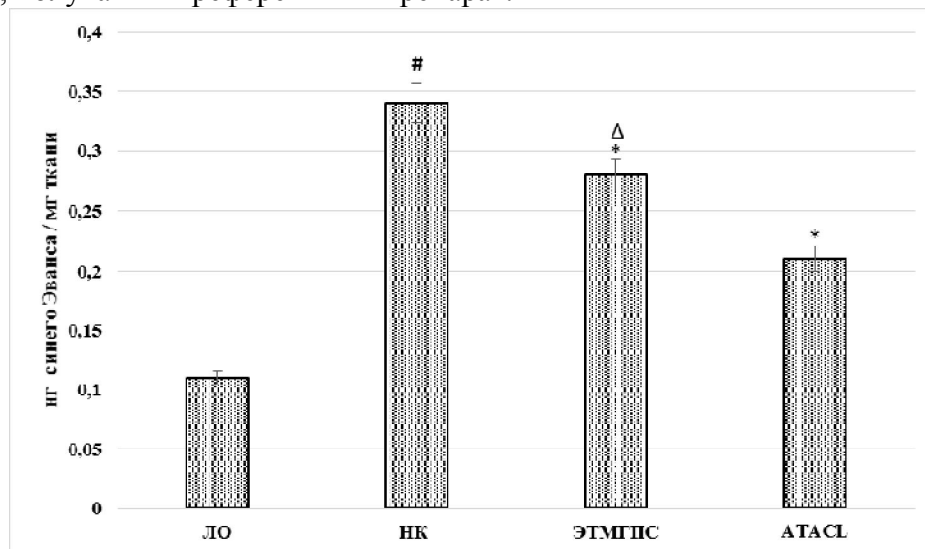


Рис. 4. Изменение степени проницаемости гематоэнцефалического барьера у ишемизированных животных на фоне введения исследуемого соединения и препарата сравнения.

Обсуждение результатов. Нейровоспаление является существенной составляющей патогенеза ишемического повреждения головного мозга и также представляет собой перспективную фармакотерапевтическую мишень. На сегодняшний день установлено, что экзогенные антиоксиданты могут способствовать редукции воспалительных процессов в мозговой ткани [16]. Исходя из этого, было выдвинуто предположение, что применение 4-гидроксиди-3,5-третбутил коричной кислоты – соединения, для которого ранее были установлены антиоксидантные свойства, будет способствовать уменьшению интенсивности воспаления мозговой ткани в условиях экспериментальной церебральной ишемии. Так, в ходе данного исследования было установлено, что применение 4-гидроксиди-3,5-третбутил коричной кислоты способствовало уменьшению концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-1 β и ФНО- α) и повышению содержания противовоспалительного ИЛ-10 в супернатанте головного мозга у крыс, что вызвало снижение проницаемости ГЭБ у животных. В тоже время на фоне применения соединения АТАСЛ отмечено снижение уровня монооксида азота (одного из маркеров повышения активности воспалительных процессов в мозговой ткани), что может объясняться регулирующим эффектом данного вещества в отношении изоферментов синтазы оксида азота. В ранее проведенных исследованиях было установлено, что введение животным 4-гидроксиди-3,5-третбутил коричной кислоты в условиях фокальной ишемии головного мозга способствовало повышению активности эндотелиальной и уменьшению активности индуцибельной изоформсинтазы оксида азота [17]. Кроме того, уменьшение проницаемости ГЭБ на фоне применения соединения АТАСЛ, вероятно, связано с прямым ингибированием матриксной металлопротеиназы типа 9 [18]. Однако, стоит отметить, что матриксная металлопротеиназа типа 9 играет значимую роль не только в прогрессировании воспалительных процессов в мозговой ткани. Так, увеличение активности матриксной металлопротеиназы типа 9 может приводит к нарушению глутаматэргической передачи в ЦНС с повышением концентрации внутриклеточного кальция и развитием эксайтотоксичности [19]. В связи с этим снижение активности матриксной металлопротеиназы типа 9 (как прямое, так и опосредованное за счет уменьшения концентрации ИЛ-1 β), наблюдаемое при применении соединения АТАСЛ, может являться одним из механизмов комплексного церебротропного влияния 4-гидроксиди-3,5- ди-третбутил коричной кислоты.

В то же время, снижение концентрации ФНО- α может опосредовать антиапоптотическую активность 4-гидрокси 3,5-ди-третбутил коричной кислоты. Известно, что ФНО- α является индуктором внешнего апоптотического пути, который связан с активацией рецепторов TRAIL, рилизингом циклофилина D и повышением активности каспазы 8 [20]. Также следует отметить, что по степени влияния на интенсивность реакций нейровоспаления соединение АТАСЛ превосходило референтный препарат – этилметилгидроксипиридинасукцинат.

Выводы:

1. Экспериментальная ишемия головного мозга, вызванная термокоагуляцией средней мозговой артерии, приводит к повышению концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-6 - в 8,4 раза ($p < 0,05$); ИЛ-1 β – в 3,5 раза ($p < 0,05$) и ФНО- α в 4,1 раза ($p < 0,05$), при снижении уровня противовоспалительного ИЛ-10, увеличении содержания монооксида азота и повреждении ГЭБ.
2. Применение этилметилгидроксипиридинасукцината в дозе 100 мг/кг (*per os*) способствовало снижению содержания провоспалительных цитокинов в мозговой ткани у крыс, уменьшению концентрации NO и степени повреждения ГЭБ на 17,6% ($p < 0,05$).
3. На фоне введения 4-гидрокси 3,5-ди-третбутил коричной кислоты в дозе 100 мг/кг (*per os*) также отмечено уменьшение концентрации ИЛ-6; ИЛ-1 β и ФНО- α , при повышении содержания ИЛ-10, снижении продукции монооксида азота и проницаемости ГЭБ. При этом фармакологический эффект от применения 4-гидрокси 3,5-ди-третбутил коричной кислоты превосходил аналогичный от введения препарата сравнения.

Список литературы:

1. Shi L, Rocha M, Leak R.K. A new era for stroke therapy: Integrating neurovascular protection with optimal reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab. 2018. 38(12). 2073-2091. doi:10.1177/0271678X18798162
2. Hu X., De Silva T.M., Chen J., Faraci F.M. Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. Circ Res. 2017. 120(3). 449-471. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308427
3. Yang C., Hawkins K.E., Doré S., Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. Am J Physiol Cell Physiol. 2019.316(2). 135-C153. doi:10.1152/ajpcell.00136.2018
4. DiSabato D.J., Quan N., Godbout J.P. Neuroinflammation. the devil is in the details. J Neurochem. 2016.139 Suppl 2(Suppl 2).136-153. doi:10.1111/jnc.13607.
5. Zhou M., Wang C.M., Yang W.L., Wang P. Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia. Brain Res. 2013. 1506. 105–114. doi. 10.1016/j.brainres.2013.02.010
6. Wilkins H.M., Swerdlow R.H. TNF α in cerebral ischemia. another stroke against you? Journal of neurochemistry. 2015. 132(4). 369–372. doi. 10.1111/jnc.13028.
7. Murray K.N., Parry-Jones A.R., Allan S.M. Interleukin-1 and acute brain injury. FrontCellNeurosci. 2015.9.18. doi. 10.3389/fncel.2015.00018.
8. Fahmi R.M., Elsaid A.F. Infarction size, interleukin-6, and their interaction are predictors of short-term stroke outcome in young Egyptian adults. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2016. 25(10). 2475–2481. doi. 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.06.021.
9. Terpolilli N.A., Moskowitz M.A., Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. J CerebBloodFlowMetab. 2012. 32(7). 1332–1346. doi. 10.1038/jcbfm.2012.12.
10. Nam M.H. Excessive Astrocytic GABA Causes Cortical Hypometabolism and Impedes Functional Recovery after Subcortical Stroke. Cell reports. 2020. 32 (1). 107861
11. Bechter K. The Challenge of Assessing Mild Neuroinflammation in Severe Mental Disorders. Front Psychiatry. 2020. 11. 773 doi:10.3389/fpsy.2020.00773

12. Yuan Y., Zha H., Rangarajan P., Ling EA, Wu C. Anti-inflammatory effects of Edaravone and Scutellarin in activated microglia in experimentally induced ischemia injury in rats and in BV-2 microglia. *BMC Neurosci.* 2014. 15. 125. doi. 10.1186/s12868-014-0125-3.
13. Duan J., Cui J., Yang Z. Neuroprotective effect of Apelin 13 on ischemic stroke by activating AMPK/GSK-3 β /Nrf2 signaling. *J Neuroinflammation.* 2019. 16(1). n24.
14. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Хури Е.И., Кульбекова Ю.Е., Кобин А.А. Оценка антиоксидантной активности 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричной кислоты, мексидола и тиоктовой кислоты на модели фокальной ишемии головного мозга. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2017. 20(2). 48-52.
15. Radu M., Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp.* 2013.(73).e50062. Published 2013 Mar 16. doi.10.3791/50062
16. Muhammad T., Ikram M., Ullah R., Rehman S.U., Kim M.O. Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- κ B Signaling. *Nutrients.* 2019. n11(3). n648. Published 2019 Mar 17. doi.10.3390/nu11030648
17. Pozdnyakov D.I., Voronkov A.V., Zolotych D.S. Possible mechanisms of endothelioprotection 4-hydroxy-3,5-di-tretbutyl cinnamic acid in the cerebral ischemia in experiment *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research.* 2018. 10(2). 189-193.
18. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Золотых Д.С., Ефремова М.П. Влияние соединения АТАСЛ на противовоспалительный потенциал эндотелия сосудов головного мозга крыс в условиях экспериментальной ишемии. *Крымский терапевтический журнал.* 2017. 4 (35). 60-63.
19. Lepeta K., Kaczmarek L. Matrix Metalloproteinase-9 as a Novel Player in Synaptic Plasticity and Schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2015. 41(5). 1003-1009. doi.10.1093/schbul/sbv036
20. Wajant H. TRAIL- and TNF-induced signaling complexes-so similar yet so different. *EMBO J.* 2017 .36(9).1117-1119.

References

1. Shi L, Rocha M., Leak R.K. A new era for stroke therapy: Integrating neurovascular protection with optimal reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018. 38(12). 2073-2091. doi.10.1177/0271678X18798162
2. Hu X, De Silva T.M., Chen J., Faraci F.M. Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. *Circ Res.* 2017. 120(3) .449-471. doi.10.1161/CIRCRESAHA.116.308427
3. Yang C., Hawkins K.E., Doré S., Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J PhysiolCellPhysiol.* 2019.316(2). 135-C153. doi.10.1152/ajpcell.00136.2018
4. DiSabato D.J., Quan N., Godbout J.P. Neuroinflammation. the devil is in the details. *J Neurochem.* 2016.139 Suppl 2(Suppl 2).136-153. doi.10.1111/jnc.13607.
5. Zhou M., Wang C.M., Yang W.L., Wang P. Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia. *Brain Res.* 2013. 1506. 105–114. doi. 10.1016/j.brainres.2013.02.010
6. Wilkins H.M., Swerdlow R.H. TNF α in cerebral ischemia. another stroke against you? *Journal of neurochemistry.* 2015. 132(4) .369–372. doi. 10.1111/jnc.13028.
7. Murray K.N., Parry-Jones AR, Allan SM. Interleukin-1 and acute brain injury. *FrontCellNeurosci.* 2015.9.18. doi. 10.3389/fncel.2015.00018.
8. Fahmi R.M., Elsaid A.F. Infarction size, interleukin-6, and their interaction are predictors of short-term stroke outcome in young Egyptian adults. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016. 25(10). 2475–2481. doi. 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.06.021.
9. Terpolilli N.A., Moskowitz M.A., Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J CerebBloodFlowMetab.* 2012. 32(7). 1332–1346. doi. 10.1038/jcbfm.2012.12.

10. Nam M.H. Excessive Astrocytic GABA Causes Cortical Hypometabolism and Impedes Functional Recovery after Subcortical Stroke. *Cell reports*. 2020. 32 (1). 107861
11. Bechter K. The Challenge of Assessing Mild Neuroinflammation in Severe Mental Disorders. *Front Psychiatry*. 2020. 11. 773 doi.10.3389/fpsyt.2020.00773
12. Yuan Y., Zha H., Rangarajan P., Ling E.A., Wu C. Anti-inflammatory effects of Edaravone and Scutellarin in activated microglia in experimentally induced ischemia injury in rats and in BV-2 microglia. *BMC Neurosci*. 2014. 15. 125. doi. 10.1186/s12868-014-0125-3.
13. Duan J., Cui J., Yang Z. Neuroprotective effect of Apelin 13 on ischemic stroke by activating AMPK/GSK-3 β /Nrf2 signaling. *J Neuroinflammation*. 2019. 16(1). n24.
14. Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Khuri E.I., Kulbekova Yu.E., Kobin A.A. Evaluation of the antioxidant activity of 4-hydroxy-3,5-ditretbutyl cinnamic acid, Mexidol, and thioctic acid on a model of focal brain ischemia. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2017. 20(2). 48-52. in Russian
15. Radu M., Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*. 2013.(73).e50062. Published 2013 Mar 16. doi.10.3791/50062
16. Muhammad T, Ikram M, Ullah R., Rehman S.U., Kim M.O. Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- κ B Signaling. *Nutrients*. 2019. n11(3). n648. Published 2019 Mar 17. doi.10.3390/nu11030648
17. Pozdnyakov D.I., Voronkov A.V., Zolotych D.S. Possible mechanisms of endothelioprotection 4-hydroxy-3,5-di-tretbutyl cinnamic acid in the cerebral ischemia in experiment *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 2018. 10(2). 189-193.
18. Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Zolotych D.S., Efremova M.P. Effect of atacl compound on the anti-inflammatory potential of the endothelium of rat brain vessels in experimental ischemia. *Crimean therapeutic journal*. 2017. 4 (35). 60-63. in Russian.
19. Lepeta K., Kaczmarek L. Matrix Metalloproteinase-9 as a Novel Player in Synaptic Plasticity and Schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2015. 41(5). 1003-1009. doi.10.1093/schbul/sbv036
20. Wajant H. TRAIL- and TNF-induced signaling complexes-so similar yet so different. *EMBO J*. 2017 .36(9).1117-1119.