

УДК 577.21

## ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ СЕМАКС И PGP НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *Vegfa* У КРЫС В УСЛОВИЯХ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2013 г. В. В. Ставчанский<sup>1\*</sup>, Т. В. Творогова<sup>2</sup>, А. Ю. Бочина<sup>2</sup>, С. А. Лимборская<sup>1, 2</sup>, В. И. Скворцова<sup>2</sup>, Н. Ф. Мясоедов<sup>1</sup>, Л. В. Дергунова<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва 123182

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт цереброваскулярной патологии и инсульта Российского государственного медицинского университета, Москва 117997

Поступила в редакцию 20.08.2012 г.

Принята к печати 01.11.2012 г.

Фактор роста сосудистого эндотелия А (VEGFA) — сигнальный гликопротеин, индуцируемый гипоксией. VEGFA вызывает рост и деление клеток эндотелия сосудов, что способствует восстановлению сосудистой сети в областях головного мозга, поврежденных ишемией. Однако на ранних стадиях ишемии этот белок принимает участие также в процессах воспаления и отека. Синтетический пептид семакс, обладающий нейропротекторными и противовоспалительными свойствами, активно применяется при ишемии головного мозга. Ранее мы обнаружили, что в условиях глобальной ишемии головного мозга семакс снижает выраженность сосудистых нарушений у крыс и активизирует синтез мРНК нейротрофинов и их рецепторов. В представленной работе изучено влияние семакса и его С-концевого фрагмента PGP на экспрессию гена *Vegfa* в различных отделах головного мозга крыс спустя 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после необратимой окклюзии общих сонных артерий. Показано, что ишемия увеличивает уровень мРНК *Vegfa* в мозге животных (через 4 ч после окклюзии — в мозжечке, коре и гиппокампе, через 8 ч — в коре и гиппокампе и через 24 ч — в коре). Введение семакса приводит к снижению уровня мРНК *Vegfa* в лобной коре (через 4, 8 и 12 ч) и гиппокампе (через 2 и 4 ч) ишемизированных крыс. Влияние PGP на экспрессию этого гена было почти незаметным. Показано, что семакс препятствует активации экспрессии гена *Vegfa* под действием гипоксии на ранних стадиях глобальной ишемии головного мозга. В свою очередь, увеличение содержания мРНК *Vegfa*, обнаруженное в гиппокампе через 24 ч после окклюзии и введения семакса, по-видимому, отражает нейропротекторные свойства препарата.

**Ключевые слова:** *Vegfa*, семакс, PGP, количественный метод ОТ-ПЦР, крысы Wistar, неполная глобальная ишемия мозга, экспрессия мРНК.

THE EFFECT OF SEMAX AND ITS C-END PEPTIDE PGP ON *Vegfa* GENE EXPRESSION IN THE RAT BRAIN DURING INCOMPLETE GLOBAL ISCHEMIA, by V. V. Stavchansky<sup>1\*</sup>, T. V. Tvorogova<sup>2</sup>, A. Y. Botsina<sup>2</sup>, V. I. Skvortsova<sup>2</sup>, S. A. Limborska<sup>1, 2</sup>, N. F. Myasoedov<sup>1</sup>, L. V. Dergunova<sup>1, 2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia; \*e-mail: bacbac@yandex.ru; <sup>2</sup>Federal Stroke Institute, Russian State Medical University Moscow, 117997 Russia). Vascular endothelial growth factor (VEGFA) is a hypoxia-inducible signal glycoprotein. VEGFA causes vascular endothelial cell growth and proliferation, that leads to the regeneration of vascular network in brain regions damaged by ischemia. However, this protein is involved in processes of inflammation and edema in early stages of ischemia. Synthetic peptide semax shows neuroprotective and anti-inflammatory properties and is actively used in the treatment of ischemia. We have previously shown that semax reduces vascular injury and activates the mRNA synthesis of neurotrophins and their receptors under global cerebral ischemia in rats. Here we have analyzed the effects of semax and its C-terminal Pro-Gly-Pro tripeptide upon *Vegfa* mRNA expression in different rat brain regions after common carotid artery occlusion. The animals were decapitated 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h after the operation. It was shown that ischemia increases levels of *Vegfa* mRNA in the rat brain of animals (4 h after the occlusion — in the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus, 8 h — in the cortex and hippocampus, and 24 h in the cortex). Semax treatment reduces *Vegfa* mRNA levels in the frontal cortex (4, 8 and 12 h after the occlusion) and hippocampus of ischemic rats (2 and 4 h). Effect of PGP on the *Vegfa* gene expression was almost negligible. Our results showed that semax prevents activating effect of hypoxia on the *Vegfa* gene expres-

Принятые сокращения: ПЦР — полимеразная цепная реакция; ОТ — обратная транскрипция; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа.

\* Эл. почта: bacbac@yandex.ru

sion in early stages of global ischemia. Furthermore, increase in the level of mRNA *Vegfa* in the hippocampus (24 h after occlusion) perhaps reflects neuroprotective properties of this drug.

**Keywords:** *Vegfa*, semax, PGP, real-time qRT-PCR, Wistar rat, incomplete global cerebral ischemia, mRNA expression.

**DOI:** 10.7868/S0026898413030166

Фактор роста сосудистого эндотелия А (VEGFA) – сигнальный гликопротеин, ключевой индуктор ангиогенеза. Между тем, этот белок обладает широким спектром действия на различные клетки головного мозга млекопитающих. Ген *Vegfa* экспрессируется нейронами, астроцитами, а также клетками эндотелия сосудов [1]. Хорошо известно, что уровень экспрессии гена *Vegfa* увеличивается при ишемии и гипоксии [2, 3]. Однако в настоящее время роль белка VEGFA в патологических и восстановительных процессах, происходящих в тканях мозга при ишемии, остается недостаточно понятной. С одной стороны, этот белок защищает от ишемии – вызывает рост и развитие сосудов в поврежденной области, препятствует гибели нервных и глиальных клеток. С другой стороны, VEGFA принимает участие в таких патологических процессах, как воспаление и отек мозга [3–5]. Оказалось, что механизмы, увеличивающие проницаемость сосудов и активацию микроглии в момент острого развития ишемии, могут негативно влиять на состояние нервной ткани [6].

Пептид семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) – синтетический аналог фрагмента адренокортикотропного гормона (4–7), к С-концу которого присоединен трипептид Pro-Gly-Pro (PGP). В настоящее время семакс успешно используется при многих неврологических заболеваниях, в том числе, связанных с нарушением мозгового кровообращения. В многочисленных опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что семакс обладает рядом важных терапевтических свойств. Особенно стоит отметить его ноотропные, нейропротекторные и противовоспалительные эффекты [7–10]. Трипептид PGP, защищающий молекулу семакса от преждевременной деградации, также проявляет некоторую регуляторную активность [11–13]. Ранее мы показали, что семакс и PGP активируют экспрессию генов нейротрофических факторов и их рецепторов в условиях экспериментальной ишемии головного мозга крыс [14, 15].

При изучении действия семакса и PGP на функциональную морфологию клеток нервной ткани в норме и при моделировании неполной глобальной ишемии мы обнаружили, что оба пептида активируют капиллярную сеть в головном мозге здоровых крыс. Кроме того, в присутствии семакса уменьшалась проявления сосудистого стаза и отека меж-

клеточного пространства в условиях ишемии [16]. Белок VEGFA считается одним из ключевых регуляторов функций сосудистого эндотелия, поэтому в представленной работе изучено влияние пептидов семакса и PGP на экспрессию мРНК гена *Vegfa* в различных отделах мозга крысы через 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после необратимой окклюзии общих сонных артерий. Эти временные отрезки были выбраны для детального анализа уровня экспрессии гена *Vegfa* в течение первых суток после окклюзии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Модель неполной глобальной ишемии.** Использовали двухмесячных самцов крыс линии Wistar ( $n = 84$ ) массой около 200 г, содержавшихся в условиях естественного освещения и свободного доступа к пище и воде. Необратимую двустороннюю окклюзию общих сонных артерий (модель “неполная глобальная ишемия мозга”) проводили под эфирным наркозом. Через 15 мин после лигирования артерий крысам внутрибрюшинно вводили один из препаратов: семакс, Pro-Gly-Pro (PGP) или физиологический раствор. Животных разделили на четыре группы: 1 – ложнооперированные животные с введенным физраствором; 2 – ишемизированные животные с введенным физраствором; 3 – ишемизированные животные, получавшие семакс; 4 – ишемизированные животные, получавшие PGP. Каждую группу, в свою очередь, разделили на подгруппы в соответствии со временем выведения животных из эксперимента: через 30 мин, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после окклюзии. В каждой подгруппе было не менее трех животных. Животным, не выведенным из эксперимента, через 1, 4 и 8 ч после наложения лигатур дополнительно вводили препараты. Семакс применяли из расчета 10 мкг/100 г веса крысы; PGP – 3.75 мкг/100 г.

**Выделение РНК** из тканей мозжечка, лобной коры и гиппокампа, синтез кДНК и ОТ-ПЦР в реальном времени проводили как описано ранее [15]. Праймеры, специфичные к гену *Vegfa* и референсному гену *Gapdh*, подобраны с помощью пакета программ OLIGO Primer Analysis Software 6.31 и синтезированы фирмой “Синтол” (Россия) (табл. 1). Амплификацию проводили в присутствии указанных праймеров на приборе Mx3000P (“Stratagene”, США) в следующем режиме: денатурация – 95°C, 10 мин; амплификация с измере-

нием флуоресценции – 95°C, 15 с; 64°C, 30 с; 72°C, 30 с (40 циклов); построение кривой плавления продуктов амплификации. Длина продуктов амплификации во всех случаях соответствовала ожидаемой. Продукты другой длины не обнаружены. Каждый образец кДНК анализировали трижды. Пороговый цикл (Ct) и кривая плавления образцов получены с помощью программного обеспечения “Mx 3000p v2.00”.

Значения уровней относительной экспрессии (*R*) определяли, обрабатывая данные пороговой флуоресценции (Ct) при помощи программы REST [17, 18]. Результаты представлены в табл. 2 и табл. 3 в виде  $R \pm SE$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни экспрессии мРНК *Vegfa* в структурах мозга крыс, подвергнутых неполной глобальной ишемии в течение 1 сут, соотносили с уровнем мРНК этого гена у ложноперирированных животных (табл. 2). Содержание мРНК *Vegfa* в мозжечке через 4 ч после лигирования сосудов было в 1.8 раза выше, чем у ложноперирированных животных. В лобной коре ишемия приводила к повышению относительного содержания мРНК *Vegfa* более чем в 2 раза через 4, 8 и 24 ч после окклюзии по сравнению с контролем. Схожие изменения наблюдались в гиппокампе ишемизированных животных, где содержание мРНК *Vegfa*

через 4 и 8 ч после окклюзии было в 2.7 и 1.9 раза выше, чем в контроле соответственно.

При анализе воздействия пептидов семакс и PGP на экспрессию мРНК *Vegfa* в отделах головного мозга крыс в качестве контроля использовали уровень этой мРНК у животных с ишемией, получавших физраствор (табл. 3). Влияние обоих пептидов на экспрессию гена *Vegfa* в мозжечке было незначительным. Однако введение PGP ишемизированным животным привело к увеличению содержания мРНК *Vegfa* в этом отделе головного мозга через 12 ч после окклюзии общих сонных артерий (в 1.6 раза относительно контроля). Эффекты семакса и PGP на экспрессию мРНК *Vegfa* в гиппокампе и лобной коре при ишемии существенно различались. Через 4, 8 и 24 ч после окклюзии под действием семакса содержание транскриптов гена *Vegfa* в лобной коре было в 2 раза ниже, чем у крыс с ишемией, получавших физраствор (0.48, 0.55, 0.52 соответственно). В гиппокампе введение семакса вызвало снижение относительного уровня мРНК *Vegfa* через 2 и 4 ч (0.59 и 0.19 от уровня мРНК *Vegfa* у животных с ишемией, получавших физраствор). Спустя 24 ч относительный уровень экспрессии мРНК *Vegfa* увеличился в 3.8 раза по сравнению с контролем. Введение PGP, напротив, не влияло на экспрессию мРНК *Vegfa* в гиппокампе при ишемии. В лобной коре относительное содержание мРНК *Vegfa* снизилось через 24 ч после наложения лигатур и вве-

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для анализа экспрессии генов

Праймер	Нуклеотидная последовательность	GeneBank acc. no.	Позиция нуклеотидов	Длина продукта, п.н.
<i>Vegfa</i> (F)	5'-CCACGACAGAAGGGGAGCA-3'	NM_031836	83–102	264
<i>Vegfa</i> (R)	5'-GTGCTGGCTTTGGTGAGG-3'		328–346	
<i>Gapdh</i> (F)	5'-TGCCATCAACGACCCCTTCA-3'	NM_017008	936–955	188
<i>Gapdh</i> (R)	5'-ACTCAGCACCAGCATCACCC-3'		1104–1123	

**Таблица 2.** Относительное содержание мРНК гена *Vegfa* в отделах головного мозга крыс при неполной глобальной ишемии

Отдел	Продолжительность ишемии, ч						
	0.5	1	2	4	8	12	24
Мозжечок	1.04 ± 0.15	1.23 ± 0.24	1.00 ± 0.14	<b>1.81 ± 0.43*</b>	1.04 ± 0.14	0.72 ± 0.11	1.16 ± 0.20
Лобная кора	1.04 ± 0.26	1.00 ± 0.25	1.06 ± 0.08	<b>2.52 ± 0.46**</b>	<b>2.52 ± 0.40**</b>	1.46 ± 0.27	<b>3.00 ± 0.43**</b>
Гиппокамп	0.90 ± 0.07	1.66 ± 0.14	1.10 ± 0.11	<b>2.70 ± 0.20*</b>	<b>1.91 ± 0.20**</b>	1.61 ± 0.24	1.65 ± 0.18

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.01$ .

Примечание. Указана кратность различий в уровне транскриптов гена *Vegfa* у ишемизированных и у ложноперирированных крыс. Жирным выделены статистически значимые результаты.

**Таблица 3.** Относительное содержание мРНК гена *Vegfa* в отделах головного мозга крыс при введении пептидов семакс и PGP

Отдел	Продолжительность ишемии, ч						
	0.5	1	2	4	8	12	24
	<i>СЕМАКС</i>						
Мозжечок	0.90 ± 0.16	0.82 ± 0.14	0.91 ± 0.16	0.95 ± 0.13	1.23 ± 0.18	1.67 ± 0.28	1.29 ± 0.21
Лобная кора	0.71 ± 0.11	0.88 ± 0.27	1.09 ± 0.12	<b>0.48 ± 0.09*</b>	<b>0.55 ± 0.08*</b>	0.81 ± 0.18	<b>0.52 ± 0.12**</b>
Гиппокамп	0.94 ± 0.08	0.73 ± 0.06	<b>0.59 ± 0.08**</b>	<b>0.19 ± 0.02**</b>	1.12 ± 0.11	0.68 ± 0.07	<b>3.84 ± 0.4*</b>
	<i>PGP</i>						
Мозжечок	1.16 ± 0.17	1.21 ± 0.39	0.99 ± 0.14	1.00 ± 0.25	0.87 ± 0.14	<b>1.55 ± 0.22**</b>	1.33 ± 0.28
Лобная кора	1.08 ± 0.17	0.94 ± 0.29	1.31 ± 0.19	0.60 ± 0.14	1.56 ± 0.2	1.09 ± 0.15	<b>0.57 ± 0.1**</b>
Гиппокамп	0.67 ± 0.1	0.74 ± 0.1	1.62 ± 0.46	0.60 ± 0.05	0.64 ± 0.07	0.65 ± 0.09	0.63 ± 0.06

\*  $p < 0.05$ .\*\*  $p < 0.01$ .

Примечание. Указана кратность различий в уровне транскриптов гена *Vegfa* у ишемизированных животных, получавших семакс, PGP или физраствор. Жирным выделены статистически значимые результаты.

дения PGP (0.57 от уровня мРНК *Vegfa* у животных с ишемией, получавших физраствор.

Активация транскрипции *Vegfa* является важной частью скоординированного ответа генома на ишемию [3]. Способность белка VEGFA стимулировать ангиогенез и вызывать прямые нейротрофические эффекты делает его потенциальной мишенью для терапевтического воздействия при ишемии. Однако имеются сведения, что этот фактор не только влияет на процессы ангиогенеза и васкуляризации в ишемизированном мозге, но и участвует в патологических процессах воспаления и отека мозга. Механизмы увеличения проницаемости сосудов и активации микроглии, которые запускаются при ангиогенезе, в момент острого развития ишемии негативно воздействуют на состояние нервной ткани [4–6]. С другой стороны,

многочисленные данные указывают, что белок VEGFA способен также проявлять нейротрофические и нейропротекторные свойства, обусловленные прямым действием этого фактора на нейрональные и глиальные клетки. Среди этих свойств особенно отмечают увеличение выживаемости нейронов, нейропролиферативную активность, активацию направленного роста аксона [1, 3, 19].

Ранее мы показали, что в условиях использованной модели под воздействием семакса увеличивается экспрессия генов нейротрофических факторов, при этом максимальный нейропротекторный эффект пептида проявился в гиппокампе животных спустя 12 ч после окклюзии сосудов, когда ишемическое повреждение привело к существенному снижению экспрессии генов нейротрофинов и их рецепторов. В данной работе мы обнаружили, что в использованной модели ишемия вызывает значительное и продолжительное увеличение экспрессии мРНК *Vegfa* в гиппокампе и лобной коре крыс. Увеличение относительного содержания мРНК *Vegfa* у крыс при ишемии наблюдали через 4 и 8 ч после окклюзии. Активация экспрессии гена *Vegfa* в тканях головного мозга под действием ишемии может быть обусловлена реакцией генома на гипоксию [3]. В нашем опыте под воздействием семакса снижалось содержание мРНК *Vegfa* в гиппокампе и лобной коре ишемизированных крыс (табл. 4). При этом можно отметить не только значительное снижение содержания мРНК *Vegfa* (0.2 от уровня у ишемизированных животных в гиппокампе через 4 ч после окклюзии), но и продолжительность этого эффекта (в лобной коре снижение наблюдалось через 4, 8 и 24 ч после наложения лигатур, в гиппокампе — через 2 и 4 ч). Полученные результаты

**Таблица 4.** Схематическое изображение эффекта семакса на содержание мРНК гена *Vegfa* в отделах головного мозга крыс, подвергнутых неполной глобальной ишемии в течение 1 сут

Отдел	Время, ч						
	0.5	1	2	4	8	12	24
Мозжечок	—	—	—	—	—	—	—
Лобная кора	—	—	—	↓	↓	—	↓
Гиппокамп	—	—	↓	↓	—	—	↑

Примечание. Стрелками указан характер изменения уровня транскриптов гена *Vegfa* в структурах головного мозга крыс с ишемией, получавших семакс, по сравнению с уровнем в структурах мозга крыс с ишемией, получавших физиологический раствор (соответствующие статистически значимые величины представлены в табл. 3), прочерк означает отсутствие статистически значимого эффекта.

говорят о существенном влиянии семакса на экспрессию этого гена. По-видимому, можно предположить, что один из путей терапевтического действия семакса связан с влиянием на функционирование системы лиганда VEGFA и его рецепторов в условиях ишемии. Влияние семакса на экспрессию мРНК *Vegfa* в первые часы ишемии можно охарактеризовать как нормализующее: семакс препятствует увеличению содержания мРНК *Vegfa*, вызванного ишемией, через 4 и 8 ч после окклюзии, приближая его к уровню мРНК этого гена у ложнооперированных животных.

Через 24 ч после окклюзии у крыс, получавших семакс, содержание мРНК *Vegfa* было выше, чем у ишемизированных животных, которым вводили физраствор. По-видимому, этот результат показывает, что у животных, получавших семакс, клетки, синтезирующие VEGFA, отличаются лучшей выживаемостью. Действительно, нами показано, что спустя 24 ч после окклюзии у животных, которым вводили физраствор, в нервной ткани возникали множественные очаги некроза, тогда как у крыс, получавших семакс, в зонах ишемических повреждений отсутствовали признаки формирования глубоких деструктивных изменений и распада клеточных элементов [16].

Введение PGP не повлияло существенно на содержание транскриптов гена *Vegfa* у крыс с ишемией. Было выявлено снижение уровня экспрессии этого гена через 24 ч и небольшое увеличение в мозжечке через 12 ч после окклюзии. Таким образом, регуляторные свойства PGP в данном опыте проявились весьма слабо.

Как можно объяснить тот факт, что семакс препятствует накоплению мРНК *Vegfa* в клетках нервной ткани на ранних этапах развития ишемии и при этом оказывает нейропротекторное действие, наблюдаемое в условиях выбранной модели? Согласно опубликованным данным [20] и полученным нами результатам, гипоксия приводит к увеличению уровня мРНК *Vegfa* в тканях головного мозга при ишемии. Можно предположить, что более низкий уровень мРНК *Vegfa* у крыс, получавших семакс, обусловлен компенсаторным эффектом препарата, направленным на снижение патологического влияния ишемии. Так, ранее уже установили, что семакс способен восстанавливать кровоснабжение в поврежденных тканях в условиях неполной глобальной ишемии [16, 21]. Этим свойством, как известно, обладают некоторые пептиды меланокортиновой природы, к числу которых принадлежит и семакс [22]. Кроме того, существенный вклад в увеличение экспрессии гена белка VEGFA при ишемических процессах может давать микроглия [23]. Семакс же проявляет противовоспалительные свойства, он снижает активность клеток микроглии,

что также может приводить к уменьшению синтеза ими мРНК *Vegfa* [24].

Таким образом, результаты нашей работы показали, что семакс препятствует увеличению экспрессии мРНК гена *Vegfa* на ранних этапах развития ишемического повреждения тканей, что, по-видимому, обусловлено его антигипоксическими свойствами. Снижение экспрессии гена *Vegfa* в этот период может, в свою очередь, уменьшить повреждающий потенциал провоспалительных каскадов и препятствовать формированию отека в тканях головного мозга.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-31528).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zachary I. 2005. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals*. **14**(5), 207–221.
2. Madan A., Curtin P.T. 1993. A 24-base-pair sequence 3' to the human erythropoietin gene contains a hypoxia-responsive transcriptional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**(9), 3928–3932.
3. Ma Y., Qu Y., Fei Z. 2011. Vascular endothelial growth factor in cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res*. **89**(7), 969–978.
4. Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q., Zhang R., Davies K., Powers C., Bruggen N., Chopp M. 2000. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* **106**(7), 829–838.
5. Ribatti D. 2005. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br. J. Haematol.* **128**(3), 303–309.
6. Guan W., Somanath P.R., Kozak A., Goc A., El-Remessy A.B., Ergul A., Johnson M.H., Alhusban A., Soliman S., Fagan S.C. 2011. Vascular protection by angiotensin receptor antagonism involves differential VEGF expression in both hemispheres after experimental stroke. *PLoS One*. **6**(9), e24551.
7. Себенцова Е.А., Денисенко А.В., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. 2005. Отставленные поведенческие эффекты хронического неонатального введения аналога АКТГ (4-10) семакса детенышам белых крыс. *Журн. высшей нервной деятельности им И.П. Павлова*. **55**(2), 213–220.
8. Storozhevych T.P., Tukhbatova G.R., Senilova Y.E., Pinelis V.G., Andreeva L.A., Myasoyedov N.F. 2007. Effects of semax and its Pro-Gly-Pro fragment on calcium homeostasis of neurons and their survival under conditions of glutamate toxicity. *Bull. Exp. Biol. Med.* **143**(5), 601–604.
9. Асташкин Е.И., Беспалова Ю.Б., Гривенников И.А., Смирнов О.Н., Глезер М.Г., Мясоедов Н.Ф. 2000. Изучение влияния семакса на Ca<sup>2+</sup>-ответы нейтрофилов человека. *Докл. Акад. Наук*. **374**(3), 401–403.

10. Bashkatova V.G., Koshelev V.B., Fadyukova O.E., Alexeev A.A., Vanin A.F., Rayevsky K.S., Ashmarin I.P., Armstrong D.M. 2001. Novel synthetic analogue of ACTH 4-10 (Semax) but not glycine prevents the enhanced nitric oxide generation in cerebral cortex of rats with incomplete global ischemia. *Brain. Res.* **894**, 145–149.
11. Ashmarin I.P., Nezavibat'ko V.N., Levitskaya N.G., Kamensky A.A. 1995. Design and investigation of ACTH(4-10) analog deprived of D-amino acids and hydrophobic radicals. *Neurosci. Res. Commun.* **16**, 105–112.
12. Мартынова К.В., Андреева Л.А., Климова П.А., Кириллова Ю.Г., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шрам С.И., Швец В.И., Мясоедов Н.Ф. 2009. Структурно-функциональное исследование глицин- и пролинсодержащих пептидов (глипролинов) как потенциальных нейропротекторов. *Био-орган. химия.* **35**(2), 165–171.
13. Сторожевых Т.П., Тухбатова Г.Р., Сенилова Я.Е., Пинелис В.Г., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. 2007. Влияние семакса и его фрагмента Pro-Gly-Pro на кальциевый гомеостаз нейронов и их выживаемость в условиях глутаматной токсичности. *Бюлл. экп. биол. медицины.* **143**(5), 538–541.
14. Дмитриева В.Г., Дергунова Л.В., Поварова О.В., Скворцова В.И., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. 2008. Действие семакса и его С-концевого трипептида PGP на экспрессию генов факторов роста и их рецепторов в условиях экспериментальной ишемии мозга крыс. *Докл. Акад. Наук.* **422**(2), 258–261.
15. Ставчанский В.В., Творогова Т.В., Боцина А.Ю., Скворцова В.И., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф., Дергунова Л.В. 2011. Семакс и его С-концевой фрагмент PGP влияют на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в условиях неполной глобальной ишемии мозга крыс. *Молекуляр. биология.* **45**(6), 1026–1035.
16. Stavchansky V.V., Yuzhakov V.V., Botsina A.Y., Skvortsova V.I., Bondurko L.N., Tsyganova M.G., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. 2011. The effect of Semax and its C-end peptide PGP on the morphology and proliferative activity of rat brain cells during experimental ischemia: a pilot study. *J. Mol. Neurosci.* **45**, 177–185.
17. Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**(9), 2002–2007.
18. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.* **30**(9), e36.
19. Jin K.L., Mao X.O., Greenberg D.A. 2000. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in *in vitro* ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 10242–10247.
20. Marti H.J., Bernaudin M., Bellail A., Schoch H., Euler M., Petit E., Risau W. 2000. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am. J. Pathol.* **156**(3), 965–976.
21. Хугаева В.К., Александрин В.В. 1997. Зависимость терапевтического эффекта пептидного препарата семакс от степени тяжести ишемии мозга. *Бюлл. экп. биол. медицины.* **124**(7), 39–42.
22. Bertolini A., Tacchi R., Vergoni A.V. 2009. Brain effects of melanocortins. *Pharmacol. Res.* **59**(1), 13–47.
23. Plate K.H., Beck H., Danner S., Allegrini P.R., Wiessner C. 1999. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**(6), 654–666.
24. Гусев Е.И., Скворцова В.И. 2001. *Ишемия головного мозга.* М.: Медицина, 260–270.