

Экспериментальное обоснование нового метода лечения ишемии коры головного мозга у крыс

Р.У. ГИНИАТУЛЛИН, А.И. КОЗЕЛЬ, А.Н. КУЗЬМИН, Г.К. ПОПОВ, Л.В. АСТАХОВА, А.М. ВОЛОДЧЕНКО, Е.Н. ИГНАТЬЕВА, Т.Г. КРАВЧЕНКО

Челябинский государственный институт лазерной хирургии, пр-т Победы, д. 287, Челябинск, 454021, Российская Федерация

В настоящее время установлены нейропротекторные свойства эритропоэтина (ЭП), связанные с антиапоптотическим и антигипоксическим действиями. Наряду с этим известно, что воздействие лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона способствует усилению микроциркуляции, повышению функциональной активности эндотелиоцитов, что приводит к активации неангиогенеза.

Цель исследования Разработать способ лечения экспериментальной ишемии коры головного мозга (ГМ) на основе исследования поведенческих и сосудистых реакций, патоморфологических изменений у животных при введении рекомбинантного ЭП и воздействии лазерного излучения.

Материал и методы Проведен эксперимент на 130 беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 220-250 г. Животные разделены на 5 серий опытов: 1-я серия - моделирование ишемии коры ГМ (n=30). 2-я серия - ишемия коры ГМ и введение внутрибрюшинно рекомбинантного ЭП (n=30). 3-я серия - ишемия коры ГМ и накожное лазерное облучение области ишемического очага (n=30). 4-я серия - ишемия коры ГМ, леченная ЭП в сочетании с накожным лазерным облучением (n=30). 5-я серия (контроль) - крысы с трепанацией черепа, но без моделирования ишемии коры ГМ (n=10). Животных выводили из эксперимента на 7, 14, 30-е сутки.

Результаты и их обсуждение Показано, что введение рекомбинантного ЭП в сочетании с лазерным излучением при ишемии коры ГМ увеличивает на ранних сроках эксперимента толерантность нейронов к гипоксическому повреждению, существенно усиливает микроциркуляцию. Вероятно, это связано с антиапоптотическим и антигипоксическим действием ЭП, а также повышением функциональной активности эндотелиоцитов при лазерном облучении.

Заключение Сочетанное воздействие рекомбинантного ЭП и лазерного излучения значительно уменьшает площадь инфаркта, усиливает пролиферацию эндотелиоцитов с развитием нового сосудистого русла на ранних сроках опытов.

Указанные структурные изменения сопровождаются более ранним регрессом неврологических расстройств и улучшением поведенческих реакций у подопытных животных.

Ключевые слова Головной мозг, ишемия, рекомбинантный эритропоэтин, лазерное излучение

Experimental Substantiation of a New Method of Treatment of Cerebral Ischemia in Rats

R.U. GINIATULLIN, A.I. KOZEL', A.N. KUZ'MIN, G.K. POPOV, L.V. ASTAKHOVA, A.M. VOLODCHENKO, E.N. IGNAT'eva, T.G. KRAVCHENKO

Cheliabinsk State Institute of Laser Surgery, 287 Pobedy Ave., Cheliabinsk, 454021, Russian Federation

Currently installed neuroprotective properties of erythropoietin (EP) associated with anti-apoptotic and antihypoxic action. Along with this, it is known that the influence of the laser radiation in the middle infrared range increases microcirculation, increase the functional activity of endothelial cells that leads to activation of neoangiogenesis.

The purpose of the study To develop a method of treating ischemia in the cerebral cortex (GM) on the basis of studies of behavioral and vascular reactions, pathological changes in animals with the introduction of recombinant EP and the influence of the laser radiation.

Materials and methods An experiment was conducted at 130 outbred adult rats of both sexes weighing 220-250g. Animals are divided into 5 series of experiments: 1-series - modeling cerebral cortex GM (n=30). 2-I series - ischemia crust GM and the introduction of intraperitoneal recombinant EP (n=30). 3 series - ischemia crust GM and cutaneous laser irradiation region of the ischemic lesion (n=30). 4-series - ischemia crust GM treated with EP in conjunction with cutaneous laser irradiation (n=30). 5 series (control) rats with craniotomy, but without modeling the cerebral cortex GM (n=10). Animals were taken from experiment 7, 14, 30 days.

Results and their discussion It is shown that the introduction of recombinant EP in combination with laser radiation in cerebral cortex GM increases in the early stages of the experiment, the tolerance of neurons to hypoxic damage, improves microcirculation. This is probably due to anti-apoptotic and antihypoxic action EP, and increased functional activity of endothelial cells under laser irradiation.

Conclusion 1. The combined effect of recombinant EP and laser radiation significantly reduces the area of the heart, enhances proliferation of endothelial cells with the development of new vasculature in the early stages of the experiments. 2. These structural changes are accompanied by an earlier regression of neurological disorders and improving behavioral reactions in experimental animals.

Key words Brain, ischemia, recombinant erythropoietin, laser radiation

В ряде исследований было отмечено, что эритропоэтин (ЭП), применяющийся в основном для лечения анемии, обладает также позитивным влиянием на функциональное состояние ЦНС в условиях ишемии [6, 9]. Наряду с этим, в экспериментальных исследованиях были получены данные о наличии рецепторов к ЭП на нейронах в ЦНС [7, 10].

Таким образом, появилась возможность использовать ЭП в виде монотерапии или в сочетании с другими методами лечения церебрального ишемического инсульта [5, 9].

Цель исследования: разработать способ лечения экспериментальной ишемии коры головного мозга (ГМ) на основе исследования поведенческих и сосудистых реакций, патоморфологических изменений в тканях мозга у животных после введения рекомбинантного ЭП и воздействия лазерного излучения.

Материал и методы

Нами проведен эксперимент на 130 беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 220-250 г. Животные содержались в условиях вивария, регламентируемых приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983г. Опыты проводили в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.09.1977 г. и № 701 от 27.07.1978 г. об обеспечении принципов гуманного отношения к животным. Все оперативные вмешательства проводились в экспериментальной операционной с соблюдением правил асептики и антисептики под внутримышечным обезболиванием Залетилом (2 мг/кг веса животного). Выведение животных из эксперимента осуществлялось путем внутрисердечного введения 3 мл 7,5% раствора хлористого калия.

Все животные были разделены на 5 серий опытов. В первой серии эксперимента на 30 крысах группы сравнения моделировали ишемию коры ГМ по методике, предложенной Г.И. Мчедлишвили [4].

После наступления стадии наркоза волосистой кожей в области операции сбривали до гладкой кожи, обрабатывали 70% этиловым спиртом. Производили разрез мягких тканей головы в проекции сагиттального шва в промежутке между лобно-теменным и теменно-затылочным швами длиной до 1,5-2,0 см. Мягкие ткани разводили и фиксировали ранорасширителем. Кость скелетировали. Высокооборотным бором в левой теменной области наносили трепанационное отверстие до 3 мм в диаметре до твердой мозговой оболочки, его расширяли до 7 мм в диаметре зажимом типа "москит". Твердую мозговую оболочку вскрывали крестообразно. С помощью электродов, изготовленных из тонких игл для инъекций, под бинокулярной лупой (х3,5; "ЛОМО") производили диатермокоагуляцию пиальных сосудов поверхности коры ГМ по краям трепанационного отверстия, в котором помещали полихлорвиниловый катетер (длина 1,5-2,0 см, диаметр - 2 мм). Конец последнего находился в контакте с мягкой мозговой оболочкой, фиксировался к коже с

помощью нити и плотно закрывался резиновым колпачком. Затем кожа ушивалась наглухо. В дальнейшем катетер использовался для исследования показателя микроциркуляции в области коры ГМ. Животных выводили из опыта на 7, 14, 30-е сутки после моделирования ишемии ГМ. На каждом сроке наблюдения исследовано 10 крыс.

Во второй серии эксперимента на 30 животных моделировали ишемию коры ГМ по методике, описанной выше (первая серия эксперимента). Через 3 часа после операции каждому животному вводили внутривенно 1000 МЕ рекомбинантного ЭП ("ЭПОКРИН 2000 МЕ") из расчета 5000 МЕ на 1 кг веса животного по международному протоколу. Затем введение препарата повторяли через 24 и 48 часов по 1000 МЕ после создания ишемии. Выведение животных из опыта осуществляли на 7, 14, 30-е сутки после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 10 крыс.

У 30 животных третьей серии эксперимента с моделью ишемии коры ГМ через 2 часа после операции проводили дистанционное накожное (2-3 см от ее поверхности), в непрерывном режиме, облучение области ишемического очага диодным лазером ИРЭ-ПОЛЮС с длиной волны 970 нм, используя моноволоконный световод диаметром 0,6 мм и морфологически обоснованные параметры - мощность 1 Вт, экспозиция 2 минуты. Животных выводили из опыта на 7, 14, 30-е сутки после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 10 крыс.

В четвертой серии эксперимента на 30 животных с моделью ишемии коры ГМ через 2 часа после операции проводили накожное облучение диодным лазером с помощью отработанных параметров (третья серия эксперимента). Затем через 3, 24 и 48 часов вводили внутривенно рекомбинантный ЭП в соответствии с международным протоколом (вторая серия эксперимента). Выведение животных из опыта проводили на 7, 14, 30-е сутки после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 10 крыс.

На 10 животных 5-й серии опытов (контроль) проводили оперативное вмешательство как и на крысах 1-й серии эксперимента (модель ишемии коры ГМ), но без диатермокоагуляции пиальных сосудов. В ходе эксперимента проводили исследование поведения животных в актографе "открытого поля" и показателя микроциркуляции в зоне коры ГМ левой теменной области на 7, 14 и 30-е сутки после операции. Полученные результаты сравнивали с таковыми у животных опытных серий экспериментов.

Поведение животных исследовали в актографе "открытого поля" [1]. Это устройство представляет собой квадратный манеж, дно которого разбито на 16 квадратов. В центре каждого квадрата имеется отверстие диаметром 3,8 см. Время наблюдения составляло 10 минут; при этом количество переходов животных по 16 квадратам рассматривалось как мера локомо-

ции (горизонтальной активности), число подъемов на задние лапы являлось критерием ориентировочной реакции (вертикальной активности), количество выглядываний через отверстие отражало исследовательское поведение, а число фекальных болюсов свидетельствовало о вегетативных последствиях эмоционального стресса, вызванного помещением животного в незнакомую обстановку. В свою очередь, количество актов груминга (самовылизывания, почесывания) отражало поведенческую реакцию животных.

Оценка показателя микроциркуляции контрольных и опытных животных производилась с использованием прибора ЛАКК-01 (Россия) на основе инфракрасного лазера с помощью трехканального светового зонда, смонтированного из кварцевых моноволоконных световодов. Показатели у анестезированных Залетиллом животных снимались датчиком зонда, введенного через полихлорвиниловый катетер непосредственно к мягкой мозговой оболочке левой теменной области ГМ в указанные выше сроки (до выведения животных из опытов). Время записи ЛДФ-граммы составляло 60 секунд. Математическая и статистическая обработка показателей прибора осуществлялась с помощью комплекта программ ООО "Лазма" (Россия). Определялся показатель микроциркуляции (ПМ), который является функцией от усредненной скорости эритроцитов (V_{cp}) и концентрации эритроцитов в зондируемом объеме тканей (N_{cp}), зависящей от показателя гематокрита и количества функционирующих сосудов: $ПМ = N_{cp} \cdot V_{cp}$. Величина ПМ измерялась в относительных перфузионных единицах (пф. ед.).

После выведения животных из эксперимента ГМ извлекали и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Серийные срезы ГМ окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Бильшовского для выявления миелиновых волокон, по методу Ниссля для определения тигроидного вещества Ниссля, глиальных клеток. Подсчитывали на условной единице площади количество нейронов (нормальных, с хроматолизом, клеток-теней), мелких кровеносных сосудов, а также определяли площадь ишемического очага (в $мкм^2$) при увеличении $\times 200$ и $\times 400$ соответственно. Результаты исследования обрабатывали статистически с использованием непараметрического U-теста Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования поведенческих реакций показали (табл. 1), что у животных 1-й серии показатели локомоции были значительно ниже по сравнению с контрольной группой (КГ) на всех сроках опытов. Кроме того, на 14-е сутки показатели локомоции достоверно уменьшались, а на 30-е сутки - увеличивались по отношению к предыдущим срокам наблюдения.

Исследование ориентировочных реакций показало, что показатели вертикальной стойки были значи-

тельно ниже по сравнению с КГ на всех сроках опыта, а на 14-е сутки - ниже по отношению к предыдущему сроку эксперимента.

У животных 1-й серии показатель исследовательского поведения был значительно ниже на всех сроках наблюдения по сравнению с КГ, а также ниже на 7-е сутки по отношению к предыдущему сроку наблюдения. Наряду с этим, показатель груминга на 30-е сутки опыта был значительно ниже по сравнению с 5-й серией.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что ПМ у животных 1-й серии был достоверно ниже, чем в КГ на всех сроках опытов (табл. 2).

На 7-е сутки у всех животных с моделью ишемии ГМ (первая серия опытов) отмечались правосторонний гемипарез и атаксия, сопровождавшиеся гиподинамией, заторможенностью, отказом от приема пищи и воды.

При гистологическом исследовании препаратов головного мозга в местах коагуляции пиальных артерий определялись некроз стенки сосудов, кровоизлияния и отек в периваскулярной ткани. Здесь же регистрировались дистрофия и некроз клеточных элементов перичеселлюлярный отек. Нейроны теряли большую часть набухших отростков, вытягивались, приобретая угловатую форму. Глыбки хроматина в нейронах исчезали, цитоплазма их бледно окрашивалась тионином. Ядра клеток сморщивались, окрашивались тионином в темно-синий цвет. Отмечалось острое набухание и лизис клеток с образованием клеток-теней. Реакция нейроглии заключалась в утолщении, фрагментации и распаде астроцитов, набухании их тел и отростков, и постепенном превращении астроцитов в амёбовидные клетки. Со стороны микроглии определялись набухание и дистрофические изменения. Миелиновые волокна коры и белого вещества головного мозга находились в состоянии набухания и вакуолизации слоя миелина. В нервных волокнах отмечалась фрагментация с последующим зернистым и глыбчатым распадом.

На 14-е сутки после воспроизведения ишемии ГМ у животных отмечалось восстановление поведенческих реакций, но оно было неполным.

Результаты наблюдения за животными коррелировали с данными гистологического исследования препаратов ГМ. В зоне коагуляции пиальных сосудов распространенность некроза и кровоизлияний несколько уменьшилась, здесь отмечалась активизация глиальных макрофагов. В то же время, в окружающей ткани мозга, по-прежнему отмечались дистрофические и некротические изменения в нейронах, явления перичеселлюлярного и периваскулярного отека, встречались клетки-тени, амёбовидные астроциты. Миелиновые волокна коры и белого вещества ГМ были набухшими, с явлениями вакуолизации слоя миелина.

На 30-е сутки после операции поведенческие реакции у животных стали несколько активнее по от-

ношению к предыдущим срокам наблюдения. К этому времени в месте коагуляции пиальных сосудов сформировался глиосоединительнотканый рубец.

Результаты количественного исследования препаратов ГМ показали (табл. 3), что число нормальных нейронов на 7-е сутки достоверно уменьшилось, а число нейронов с хроматолитом и клеток-теней увеличилось. Начиная с 7-х суток и в последующие сроки опы-

та отмечалось значительное увеличение содержания кровеносных сосудов.

После нарушения мозгового кровообращения у всех животных, леченных рекомбинантным ЭП (2-я серия опытов), наблюдалась ранняя активация поведения (табл. 1). Уже через 2-3 часа после однократного введения препарата и в последующие сроки опыта у них отсутствовали признаки нарушения мозгового

Таблица 1

Динамика изменений поведения животных различных серий опытов в актографе "открытого поля" (M±m)

Виды поведения	Серия опыта	Сроки наблюдения			
		1-3 часа	7-е сутки	14-е сутки	30-е сутки
Локомоция (смена квадратов)	1-я	26,8±1,5****	24,1±1,2****	16,2±0,4*****	20,3±1,7*****
	2-я	36,7±1,1*****	34,2±1,2*	21,4±0,8*****	30,8±1,9*****
	3-я	32,3±1,2*****	28,1±1,2*****	20,9±0,7*****	29,7±1,1*****
	4-я	46,8±2,1*****	34,9±2,2*****	21,8±0,9*****	31,8±1,3*****
	5-я	47,8±3,2	35,2±2,2****	22,3±1,1****	31,4±2,1****
Ориентировочная реакция (вертикальная стойка)	1-я	7,7±0,5****	6,9±0,6****	4,1±0,3*****	5,3±0,7****
	2-я	10,8±0,6*****	9,9±0,4*	7,1±0,3*****	8,3±0,6*
	3-я	8,9±0,4****	8,1±0,3*****	6,9±0,4*	7,4±0,4*
	4-я	14,9±1,1*****	10,7±0,6*****	7,1±0,5*****	8,3±0,6*
	5-я	15,4±1,2	10,9±0,5****	7,2±0,4*****	8,5±0,5
Исследовательское поведение (выглядывание через отверстия)	1-я	8,1±0,8****	4,3±0,7*****	3,2±0,3****	4,1±0,4****
	2-я	12,1±0,9*****	8,9±0,6*****	6,9±0,4*****	7,9±0,6*
	3-я	10,1±0,8****	6,3±0,3*****	6,6±0,3*	7,4±0,5*
	4-я	16,9±0,9*	9,7±0,6*****	7,1±0,5*****	8,1±0,4*
	5-я	17,7±1,4	9,9±0,8****	7,2±0,4*****	8,3±0,5
Груминг	1-я	2,1±0,3	1,7±0,2	1,4±0,1	1,8±0,2***
	2-я	2,9±0,4	2,5±0,3	1,8±0,2	3,1±0,3*****
	3-я	2,5±0,3	2,1±0,2	1,6±0,1	2,9±0,4*****
	4-я	3,1±0,4	2,4±0,3	1,8±0,3	3,3±0,2*****
	5-я	3,4±0,6	2,3±0,7	1,7±0,3	3,2±0,7
Дефекация	1-я	1,1±0,2	1,4±0,3	1,9±0,2	1,2±0,1*****
	2-я	0,7±0,1	1,1±0,2	1,2±0,1*	0,6±0,2*****
	3-я	0,8±0,2	1,2±0,1	1,3±0,2	0,7±0,3
	4-я	0,7±0,1	0,9±0,2	1,1±0,3	0,6±0,3
	5-я	0,6±0,2	1,1±0,1*****	1,3±0,2	0,7±0,2*

Примечание: 1-я серия опыта - крысы с моделью ишемии коры ГМ (группа сравнения); 2-я серия опыта - крысы с моделью ишемии коры ГМ, леченные рекомбинантным эритропоэтином (РЭП); 3-я серия опыта - крысы с моделью ишемии коры ГМ, леченные лазерным излучением; 4-я серия опыта - крысы с моделью ишемии коры ГМ, леченные лазерным излучением в сочетании с РЭП; 5-я серия опыта - контроль; * - p<0,05 по сравнению с 1-й серией опыта; ** - p<0,05 по сравнению со 2-й серией опыта; *** - p<0,05 по сравнению со 3-й серией опыта; **** - p<0,05 по сравнению с 5-й серией опыта; ***** - p<0,05 по сравнению с предыдущими сроками наблюдения.

Таблица 2

Динамика показателя микроциркуляции в тканях ГМ животных различных серий опытов (M±m; пф. ед)

Серия опыта	Сроки наблюдения (сутки)		
	7-е	14-е	30-е
1-я	2,8±0,6*	3,1±0,7*	3,8±0,3*
2-я	6,3±0,5**	5,7±0,6**	5,6±0,4**
3-я	4,5±0,4****	4,8±0,5**	5,1±0,5**
4-я	7,8±0,5*****	6,8±0,4*****	6,1±0,4**
5-я	5,8±0,4	5,8±0,3	5,9±0,3

Примечание: 1-я серия опыта - животные с моделью ишемии коры ГМ (группа сравнения); 2-я серия опыта - животные с ишемией коры ГМ, леченные РЭП; 3-я серия опыта - животные с ишемией коры ГМ, леченные лазерным излучением; 4-я серия опыта - животные с ишемией коры ГМ, леченные лазерным излучением в сочетании с РЭП; 5-я серия опыта - контроль; * - p<0,05 по сравнению с контролем; ** - p<0,05 по сравнению с 1-й серией опыта; *** - p<0,05 по сравнению со 2-й серией опыта; **** - p<0,05 по сравнению с 3-й серией опыта.

кровообращения и они активно пили воду и принимали пищу.

Показатели локомоции животных 2-й серии были достоверно выше по сравнению с 1-й серией на всех

сроках опыта, но были существенно ниже через 2-3 часа после введения ЭП по сравнению с КГ. Наряду с этим, на 14-е сутки опыта показатели локомоции значительно уменьшились, а на 30-е сутки - увеличились

Table 1

Dynamics changes in animal behavior from different series of experiments "open field" (M ± m)

Types of behavior	Series of experiment	Observation period			
		1-3 hours	7th day	14th day	30th day
Locomotion (change of squares)	1st	26,8±1,5****	24,1±1,2****	16,2±0,4*****	20,3±1,7*****
	2nd	36,7±1,1****	34,2±1,2*	21,4±0,8*****	30,8±1,9*****
	3rd	32,3±1,2*****	28,1±1,2*****	20,9±0,7*****	29,7±1,1*****
	4th	46,8±2,1*****	34,9±2,2*****	21,8±0,9*****	31,8±1,3*****
	5th	47,8±3,2	35,2±2,2****	22,3±1,1****	31,4±2,1****
Indicative reaction	1st	7,7±0,5****	6,9±0,6****	4,1±0,3*****	5,3±0,7****
	2nd	10,8±0,6****	9,9±0,4*	7,1±0,3*****	8,3±0,6*
	3rd	8,9±0,4****	8,1±0,3*****	6,9±0,4*	7,4±0,4*
	4th	14,9±1,1*****	10,7±0,6*****	7,1±0,5*****	8,3±0,6*
	5th	15,4±1,2	10,9±0,5****	7,2±0,4****	8,5±0,5
Exploratory behavior	1st	8,1±0,8****	4,3±0,7*****	3,2±0,3****	4,1±0,4****
	2nd	12,1±0,9****	8,9±0,6*****	6,9±0,4*****	7,9±0,6*
	3rd	10,1±0,8****	6,3±0,3*****	6,6±0,3*	7,4±0,5*
	4th	16,9±0,9*	9,7±0,6*****	7,1±0,5*****	8,1±0,4*
	5th	17,7±1,4	9,9±0,8****	7,2±0,4****	8,3±0,5
Grooming	1st	2,1±0,3	1,7±0,2	1,4±0,1	1,8±0,2***
	2nd	2,9±0,4	2,5±0,3	1,8±0,2	3,1±0,3*****
	3rd	2,5±0,3	2,1±0,2	1,6±0,1	2,9±0,4*****
	4th	3,1±0,4	2,4±0,3	1,8±0,3	3,3±0,2*****
	5th	3,4±0,6	2,3±0,7	1,7±0,3	3,2±0,7
Defecation	1st	1,1±0,2	1,4±0,3	1,9±0,2	1,2±0,1*****
	2nd	0,7±0,1	1,1±0,2	1,2±0,1*	0,6±0,2*****
	3rd	0,8±0,2	1,2±0,1	1,3±0,2	0,7±0,3
	4th	0,7±0,1	0,9±0,2	1,1±0,3	0,6±0,3
	5th	0,6±0,2	1,1±0,1*****	1,3±0,2	0,7±0,2*

Comment: 1st-series experience - rat model with ischemia of the cerebral cortex (the comparison group); 2nd test series - rat model with ischemia cortex treated with recombinant erythropoietin (REP); Third test series - rat model with ischemia cortex treated with laser light; 4th series of experience - rat model with ischemia cortex treated with laser radiation in conjunction with the RAP; 5 Series experience - control; * - P < 0,05 compared with the 1st series experiment; ** - P < 0,05 compared with the 2nd series experiment; *** - P < 0,05 as compared to the third series experiment; **** - P < 0,05 compared with the 5th series of experiences; ***** - P < 0,05 compared with previous periods observation.

Table 2

Changes of microcirculation in the brain tissue animals from different series of experiments (M±m; pF. Units)

Series of experiment	Observation period (days)		
	7	14	30
1st	2,8±0,6*	3,1±0,7*	3,8±0,3*
2nd	6,3±0,5**	5,7±0,6**	5,6±0,4**
3rd	4,5±0,4*****	4,8±0,5**	5,1±0,5**
4th	7,8±0,5*****	6,8±0,4*****	6,1±0,4**
5th	5,8±0,4	5,8±0,3	5,9±0,3

Comment: 1st series of experiment - animal models with ischemia of the cerebral cortex (the comparison group); 2nd series of experiment - animals with ischemic cerebral cortex treated with recombinant erythropoietin; 3rd series of experiment - animals with ischemic cerebral cortex treated with laser light; 4th series of experiment - animals with ischemic cerebral cortex treated with laser radiation in combination with recombinant erythropoietin; 5th series of experiment - control; * - p < 0,05 compared with the control; ** - p < 0,05 compared with the 1st series experiment; *** - p < 0,05 compared with the 2nd series experiment; **** - p < 0,05 compared with the third series of experiment.

по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. В то же время, показатель ориентировочных реакций был достоверно выше по сравнению с 1-й серией на всех сроках опыта, а на 7-е сутки - ниже по сравнению с КГ;

на 14-е сутки - ниже по отношению к предыдущему сроку опыта. Показатель исследовательского поведения был достоверно выше на всех сроках опытов по сравнению с 1-й серией, а через 2-3 часа после введения

Таблица 3

Динамика количественных изменений исследованных показателей в ишемизированных тканях головного мозга крыс различных серий опытов (M±m)

Исследованный показатель (на условной единице площади)	Серия опыта	Сроки наблюдения (сутки)		
		7-е	14-е	30-е
Количество нормальных нейронов	1-я	37,2±2,4*	30,1±2,8	25,1±3,8
	2-я	83,3±1,4**	89,4±1,2***	91±2,7**
	3-я	64,1±0,9****	71,5±1,2****	82,6±1,1****
	4-я	92,4±1,2****	94,6±1,3****	98,9±1,9****
Число нейронов с хроматолизом	1-я	25,8±0,5*	33,9±0,6*	41,9±0,7*
	2-я	9,6±0,3***	7,2±0,2***	6,1±0,1**
	3-я	11,9±0,4****	9,7±0,3****	7,4±0,3****
	4-я	8,1±0,2****	6,5±0,3****	4,1±0,2****
Число клеток-теней	1-я	63,1±2,1*	69,8±1,3*	75,7±1,5*
	2-я	10,2±0,7***	7,1±0,4***	3,4±0,2***
	3-я	15,5±0,5****	11,6±0,5****	7,8±0,3****
	4-я	7,2±0,3****	4,1±0,2****	2,1±0,1****
Количество мелких кровеносных сосудов	1-я	7,1±0,3*	9±0,6*	14,1±0,7*
	2-я	16,3±0,5***	19,5±0,4***	25,7±0,8***
	3-я	19,5±0,4****	23,7±0,6****	28,9±0,7****
	4-я	25,7±0,5****	31,9±0,7****	34,8±0,6****

Примечание: 1-я серия опыта - модель ишемии головного мозга (группа сравнения); 2-я серия опыта - модель ишемии головного мозга, леченная рекомбинантным эритропоэтином; 3-я серия опыта - модель ишемии головного мозга, леченная лазерным излучением; 4-я серия опыта - модель ишемии головного мозга, леченная лазерным излучением в сочетании с рекомбинантным эритропоэтином; * - p<0,05 по сравнению с предыдущим сроком опыта в каждой серии; ** - p<0,05 по отношению к 1-й серии опыта; *** - p<0,05 по сравнению со 2-й и 3-й серией опытов; **** - p<0,05 по сравнению со 2-й серией опыта.

Table 3

Dynamics of changes in the investigated parameters in the ischemic brain tissue rats from different series of experiments (M ± m)

Investigated parameters	Series of experiment	Observation period (days)		
		7-th	14-th	30-th
Number of normal neurons	1st	37,2±2,4*	30,1±2,8	25,1±3,8
	2nd	83,3±1,4**	89,4±1,2***	91±2,7**
	3rd	64,1±0,9****	71,5±1,2****	82,6±1,1****
	4th	92,4±1,2****	94,6±1,3****	98,9±1,9****
Number of neurons with chromatolysis	1st	25,8±0,5*	33,9±0,6*	41,9±0,7*
	2nd	9,6±0,3***	7,2±0,2***	6,1±0,1**
	3rd	11,9±0,4****	9,7±0,3****	7,4±0,3****
	4th	8,1±0,2****	6,5±0,3****	4,1±0,2****
Number of cells shadows	1st	63,1±2,1*	69,8±1,3*	75,7±1,5*
	2nd	10,2±0,7***	7,1±0,4***	3,4±0,2***
	3rd	15,5±0,5****	11,6±0,5****	7,8±0,3****
	4th	7,2±0,3****	4,1±0,2****	2,1±0,1****
Number of small blood vessels	1st	7,1±0,3*	9±0,6*	14,1±0,7*
	2nd	16,3±0,5***	19,5±0,4***	25,7±0,8***
	3rd	19,5±0,4****	23,7±0,6****	28,9±0,7****
	4th	25,7±0,5****	31,9±0,7****	34,8±0,6****

Comment: 1st series of experiment - a model of cerebral ischemia (control group); 2nd series of experiment - a model of cerebral ischemia, treatment with recombinant erythropoietin; 3rd series of experiment - a model of cerebral ischemia, treatment with laser radiation; 4th series of experiment - a model of cerebral ischemia, treatment with laser radiation in combination with recombinant erythropoietin; * - p<0,05 compared with the the preceding period in each experiment series; ** - p<0,05 with respect to the 1st series of experiments; *** - p<0,05 compared with the 2nd and 3rd series of experiments; **** - p<0,05 compared with the 2nd series of experiment.

ния ЭП - ниже по сравнению с КГ; на 7-е и 14-е сутки - ниже, а на 30-е сутки - выше по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Показатель груминга на 30-е сутки был достоверно выше по сравнению с 1-й серией и предыдущим сроком опыта. Напротив, показатель дефекации был значительно ниже по сравнению с 1-й серией и предыдущим сроком опыта.

В то же время, у животных 2-й серии ПМ по сравнению с КГ не отличался. Напротив, ПМ 2-й серии животных был значительно выше на всех сроках опытов по отношению к 1-й серии (табл. 2).

При исследовании гистологических препаратов ГМ на 7-е сутки в зоне коагуляции пиальных сосудов сформировались глиосоединительнотканые рубцы. В этой же зоне сохранялись единичные мелкоочаговые кровоизлияния. Здесь на 14-е сутки опыта в области кровоизлияний определялись кистовидные полости.

В указанные сроки наблюдения (7, 14, 30-е сутки) в окружающей ткани мозга отмечалась хорошая сохранность нейронов, среди которых встречались отдельные гиперхромные клетки, а единичные - были с признаками острого набухания и сморщивания. Определялись полнокровные сосуды, активная пролиферация глиоцитов и эндотелиоцитов капилляров и артериол, неповрежденные нервные волокна.

Результаты количественного исследования препаратов ГМ показали (табл. 3), что содержание нормальных нейронов и кровеносных сосудов существенно увеличивалось, а число нейронов с хроматолизом и клеток-теней уменьшалось, начиная с 7-х суток и в последующие сроки опытов. Кроме того, количество нормальных нейронов и кровеносных сосудов было достоверно больше, а клеток с хроматолизом и клеток-теней - меньше на всех сроках опыта по сравнению с 1-й серией опыта.

Начиная с 7-х суток опыта, у всех животных с моделью ишемии ГМ, леченной лазерным излучением (3-я серия), наблюдалось медленное восстановление поведенческих реакций. Большинство из них принимали пищу и воду.

Показатели локомоции животных 3-й серии опыта были существенно выше по сравнению с 1-й серией на всех сроках опыта, но были достоверно ниже по сравнению с КГ через 1-3 часа после лазерного облучения и на 7-е сутки наблюдения (табл. 1). В эти же сроки показатели локомоции были значительно ниже по сравнению со 2-й серией наблюдения, на 7-е и 14-е сутки эксперимента были значительно ниже, а на 30-е сутки - выше по сравнению с предыдущим сроком опыта. Кроме того, показатель ориентировочных реакций был существенно ниже по сравнению с КГ на 7-е и 14-е сутки, а на 14-е и 30-е сутки - выше по сравнению с 1-й серией; на 7-е сутки - значительно ниже по сравнению со 2-й серией.

Наряду с этим, показатель исследовательского поведения был значительно ниже через 1-3 часа после лазерного облучения и на 7-е сутки по сравнению с КГ,

но выше на 7-е, 14-е и 30-е сутки по сравнению с 1-й серией; на 7-е сутки - ниже по сравнению с предыдущим сроком опыта. Показатель груминга на 30-е сутки опыта был достоверно больше по сравнению с 1-й серией и предыдущим сроком наблюдения. Напротив, показатель дефекации существенно не отличался от других серий опыта на всех сроках наблюдения.

У животных 3-й серии ПМ существенно не отличался от такового КГ животных на всех сроках опытов, однако был достоверно больше, чем в 1-й серии на всех сроках опытов. Наряду с этим, ПМ был значительно ниже на 7-е сутки по сравнению со 2-й серией, а в остальные сроки не отличался (табл. 2).

При гистологическом исследовании препаратов ГМ в зоне коагуляции пиальных сосудов определялись признаки некроза эндотелия и стенки отдельных капилляров и артериол, сопровождавшиеся мелкоочаговыми кровоизлияниями. В окружающей ткани мозга отмечались деструктивные изменения ядер и цитоплазмы отдельных нейронов, а также пролиферация эндотелиоцитов и глиоцитов. Данные морфологические изменения сохранялись до 14-х суток опыта. На этом сроке наблюдения в местах кровоизлияний сформировались мелкие кистовидные полости, которые сохранялись вплоть до 30-х суток эксперимента. В это время регистрировалась лучшая сохранность нейронов, лишь единичные из которых находились в состоянии набухания и сморщивания. Наблюдалась гиперемия, пролиферация глиоцитов, а также эндотелиоцитов капилляров и артериол, ремиелинизация поврежденных нервных волокон.

Результаты морфометрического исследования препаратов ГМ показали (табл. 3), что число нормальных нейронов и кровеносных сосудов значительно увеличивалось, а количество нейронов с хроматолизом и клеток-теней - уменьшалось, начиная с 7-х суток опыта, а также по сравнению с 1-й серией эксперимента на всех сроках наблюдения. Кроме того, содержание нормальных нейронов было существенно меньше, а число нейронов с хроматолизом, клеток-теней и кровеносных сосудов - больше по отношению ко 2-й серии опытов.

У всех животных с ишемией ГМ, леченных рекомбинантным ЭП в сочетании с лазерным облучением (4-я серия), уже через 1-2 часа после однократного введения препарата и лазерного воздействия регистрировалось достаточно полное восстановление поведенческих реакций (табл. 1).

У животных 4-й серии показатели локомоции были значительно выше по сравнению с 1-й серией на всех сроках опыта, а также по отношению ко 2-й серии через 1-2 часа после введения ЭП и лазерного облучения. Кроме того, через 1-2 часа и на 7-е сутки опыта показатели локомоции были значительно выше по сравнению с 3-й серией опыта, а на 7-е, 14-е сутки были достоверно ниже, а на 30-е сутки - выше по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Кроме

того, показатель ориентировочных реакций был достоверно выше по сравнению с 1-й серией на всех сроках наблюдения, через 1-2 часа после начала лечения - выше по сравнению со 2-й и 3-й серией, а на 7-е сутки - выше только по сравнению с 3-й серией. На 7-е и 14-е сутки - ниже, а на 30-е сутки - выше по сравнению с предыдущим сроком опыта.

Показатель исследовательского поведения у животных 4-й серии был значительно выше на всех сроках наблюдения по сравнению с 1-й серией, а на 7-е и 14-е сутки - ниже по сравнению с предыдущим сроком опыта. Показатель груминга был значительно выше по сравнению с 1-й серией и предыдущим сроком на 30-е сутки опыта. Наряду с этим, показатель дефекации существенно не отличался по сравнению с другими сериями опытов на всех сроках наблюдения.

У животных 4-й серии ПМ на 7-е сутки был достоверно выше, чем в КГ, а в остальные сроки не отличался. Кроме того, ПМ 4-й серии на всех сроках опытов был значительно выше по сравнению с 1-й серией, на 7-е сутки - со 2-й серией, на 7-е, 14-е сутки - с 3-й серией, а на 30-е сутки - не отличался (табл. 2).

На 7-е сутки эксперимента в гистологических препаратах ГМ животных 4-й серии определялись одиночные мелкоочаговые кровоизлияния, сформированные глиосоединительнотканые рубцы в местах коагуляции пиальных сосудов. В окружающей ткани ГМ отмечались хорошо сохранившиеся нейроны, среди которых лишь единичные находились в состоянии набухания и сморщивания. Определялись хорошо сохранившиеся нервные волокна, полнокровные сосуды, выраженная пролиферация глиоцитов, эндотелиоцитов капилляров и артериол с образованием нового сосудистого русла.

Сходные морфологические изменения сохранялись на 14 и 30-е сутки, но лишь с той разницей, что на указанных сроках наблюдения в зоне мелкоочаговых кровоизлияний определялись мелкие кистовидные полости.

Результаты количественного исследования препаратов ГМ животных 4-й серии показали (табл. 3),

Список литературы

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Издательство ЧГПУ, 2000; 25-33.
2. Головнева Е.С. О роли тучных клеток в стимуляции процесса неоангиогенеза в ответ на воздействие высокоинтенсивного лазерного излучения. Лазерная медицина, 2001; 5: 29-32.
3. Козель А.И., Попов Г.К., Гиниатуллин Р.У., Астахова Л.В., Кузьмин А.Н., Игнат'ева Е.Н., Кравченко Т.Г. Способ лечения ишемии головного мозга в эксперименте: Патент РФ на изобретение № 2495688 от 20.10.2013.
4. Мчедlishvili Г.И. Моделирование заболеваний центральной нервной системы. Моделирование заболеваний. Под редакцией С.В. Андреева. Москва: Медицина, 1973; 79-81.

что число нормальных нейронов и кровеносных сосудов увеличивалось с 7-х до 30-х суток опытов, а содержание нейронов с хроматолизом и клеток-теней уменьшалось в те же сроки наблюдения. Кроме того, число нормальных нейронов и кровеносных сосудов было значительно больше, а содержание нейронов с хроматолизом и клеток-теней меньше на всех сроках наблюдения по сравнению с 1, 2 и 3-й серией экспериментов.

Таким образом, результаты проведенного экспериментального исследования показали, что использование рекомбинантного ЭП в сочетании с лазерным облучением, как одного из способов лечения ишемических поражений ГМ [3], значительно увеличивает толерантность нейронов к гипоксическому повреждению. Это объясняется, вероятно, тем, что ЭП обладает антиапоптотическим и антигипоксическим действием, стимулирует ангио- и нейрогенез [6, 8, 9, 11]. В то же время, воздействие лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона, глубоко проникающего в ткани, способствует усилению микроциркуляции, повышению функциональной активности различных клеток, включая эндотелиоциты сосудов, что приводит к активации неоангиогенеза в облучаемых тканях [2].

Заключение

По данным экспериментального исследования, применение лазерного излучения в сочетании с рекомбинантным ЭП для лечения ишемии коры ГМ у крыс [3] в сравнении с другими методами (только лазерное облучение или введение рекомбинантного ЭП) способствует на ранних сроках опытов более выраженному предотвращению деструктивных изменений в нейронах, существенному уменьшению площади инфаркта, усилению пролиферации глиоцитов, эндотелиоцитов с образованием нового микроциркуляторного русла. Это сопровождается в динамике наблюдения более ранним регрессом и исчезновением неврологических расстройств, восстановлением поведенческих реакций у животных.

References

1. Volchegorskii I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseilikman V.E. *Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions*. Cheliabinsk: CSPU Publisher, 2000; 25- 33. - (In Russ.).
2. Golovneva E.S. On the role of mast cells in the process of stimulation of neoangiogenesis in response to high-intensity laser radiation. *Lazernaia meditsina*, 2001; 5: 29-32. - (In Russ.).
3. Kozel' A.I., Popov G.K., Giniatullin R.U., Astakhova L.V., Kuz'min A.N., Ignat'eva E.N., Kravchenko T.G. *Sposob lecheniia ishemii golovnogo mozga v eksperimente* [Method for treating of cerebral ischemia in experiment]. Patent RF no. 2495688, 2013. - (In Russ.).
4. Mchedlishvili G.I. *Modelirovanie zabolevanii tsentral'noi nervnoi sistemy. Modelirovanie zabolevanii*. [Modeling diseases of the central nervous system. Modeling diseases].

5. Онищенко Л.С., Гайкова О.Н., Янишевский С.Н. Изменения в очаге экспериментального ишемического инсульта под воздействием нейропротективных препаратов. *Морфология*, 2006; 6: 40-46.
 6. Celik M., Gokmen N., Erbayraktar S. et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 2258-2263.
 7. Masuda S., Nagan M., Takahata K. et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 11208-11216.
 8. Santhanam A.V., Katusic Z.S. Erythropoietin and cerebral vascular protection: role of nitric oxide. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2006; 27: 1389-1394.
 9. Siren A. L., Fratelli M., Brines M. et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 4044-4049.
 10. Taoufik E, Petit E, Divoux D, Tseveleki V, Mengozzi M, Roberts ML, Valable S, Ghezzi P, Quackenbush J, Brines M, Cerami A, Probert L. TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. *PNAS*, 2008; 105: 16: 6185-6190.
 11. Wang L., Zhang Z., Wang Y., Zhang R., Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 2004; 35: 1732-1737.
- Поступила 05.05.2014

Information about the Authors

1. Giniatullin R. – MD, Prof., Vice Director, State Budget Institution of Health Center to provide specialized medical care, "Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery". E-mail: main@cgilh.chel.su;
2. Kozel' A. - MD, Prof., Director, State Budget Institution of Health Center to provide specialized medical care, "Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery";
3. Kuz'min A. – Chairman of the Department of Neurosurgery, State Budget Institution of Health Regional Clinical Hospital №3;
4. Popov G. - MD, Prof., worked at the State Budget Institution of Health Center to provide specialized medical care, "Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery";
5. Astakhova L. – Ph.D., Head of the Department of the Scientific Research, State Budget Institution of Health Center to provide specialized medical care, "Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery";
6. Volodchenko A. – Neurosurgeon, Department of Neurosurgery, State Budget Institution of Health Regional Clinical Hospital №3;
7. Ignat'eva E. – Ph.D., Senior Scientific Researcher, Division of Engineering and Physics, State Budget Institution of Health Center to provide specialized medical care, "Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery";
8. Kravchenko T. – Ph.D., Senior Scientific Researcher, Division of Engineering and Physics, State Budget Institution of Health Center to provide specialized medical care, "Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery".

- Edited by S.V. Andreev. Moscow: Medicine, 1973; 79-81. - (In Russ.).
5. Onishchenko L.S., Gaikova O.N., Ianishevskii S.N. Changes in the focus of experimental ischemic stroke under the influence of neurotropic drugs. *Morfologiya*, 2006; 6: 40-46. - (In Russ.).
 6. Celik M., Gokmen N., Erbayraktar S. et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 2258-2263.
 7. Masuda S., Nagan M., Takahata K. et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 11208-11216.
 8. Santhanam A.V., Katusic Z.S. Erythropoietin and cerebral vascular protection: role of nitric oxide. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2006; 27: 1389-1394.
 9. Siren A. L., Fratelli M., Brines M. et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 4044-4049.
 10. Taoufik E, Petit E, Divoux D, Tseveleki V, Mengozzi M, Roberts ML, Valable S, Ghezzi P, Quackenbush J, Brines M, Cerami A, Probert L. TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. *PNAS*, 2008; 105: 16: 6185-6190.
 11. Wang L., Zhang Z., Wang Y., Zhang R., Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 2004; 35: 1732-1737.

Received 05.05.2014

Информация об авторах

1. Гиниатуллин Р.У. - д.м.н, проф., ГБУЗ ЦОСМП "Челябинский государственный институт лазерной хирургии", зам. директора по науке. E-mail: main@cgilh.chel.su;
2. Козель А.И. - д.м.н., проф., член-корреспондент РАМН, ГБУЗ ЦОСМП "ЧГИЛХ", директор;
3. Кузьмин А.Н. - Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Областная клиническая больница № 3" г. Челябинска, зав. отделением нейрохирургии № 1. E-mail: ak_n@gambler.ru;
4. Попов Г.К. - д.м.н., проф., "Челябинский государственный институт лазерной хирургии";
5. Астахова Л.В. – к.м.н., ГБУЗ ЦОСМП "ЧГИЛХ", руководитель отдела фундаментальных исследований;
6. Володченко А.М. - Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Областная клиническая больница № 3" г. Челябинска, врач-нейрохирург отделения нейрохирургии № 2;
7. Игнат'ева Е.Н. - к.б.н., ГБУЗ ЦОСМП "ЧГИЛХ", старший научный сотрудник инженерно-физического отдела;
8. Кравченко Т.Г. - к.б.н., ГБУЗ ЦОСМП "ЧГИЛХ", старший научный сотрудник инженерно-физического отдела.