

Пашин Сергей Сергеевич

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ ТЕРАПИИ ПО
ДИНАМИКЕ АВТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИХ И ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВЫЗВАННОЙ ИШЕМИИ ГРУДНОГО
ОТДЕЛА СПИННОГО МОЗГА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Научный руководитель:

член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор

Кузнецов Сергей Львович

Официальные оппоненты:

Румянцева Татьяна Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра анатомии человека, заведующий кафедрой;

Павлов Артем Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, кафедра анатомии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Защита состоится «15» февраля 2021 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), по адресу: 119435, г. Москва, ул. Россолимо 15/13.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 20__ года.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент



Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ишемия спинного мозга часто возникает при его опухолях, смещении межпозвоночных дисков, спинальных травмах, стенозе брюшной аорты, операциях на сердце, реанимационных мероприятиях после остановки сердца [Wahlgren, Wahlberg, 2005; Yamauchi et al., 2005; Maldonado et al., 2004; Takahashi, et al. 2005].

Нарушения, возникающие в структуре спинного мозга при ишемии, могут стать причиной частичного или полного паралича конечностей и других органов, вплоть до летального исхода [Morandi et al, 2004, Yamauchi et al. 2007].

Патологический процесс, первоначально локализованный в относительно небольшом участке спинного мозга, может, постепенно разрастаясь, затронуть более обширные области не только спинного, но и головного мозга, а также вегетативной нервной системы (Lee J.-M., et al., 1999). Кроме того, ишемия спинного мозга, как правило, сопровождается развитием вторичной патологии, проявляющейся в нарушениях деятельности активных нервных структур, мышечной дистрофии, костных деформациях, камнеобразовании, почечной недостаточности и др [Hewson D.W. et al., 2018].

Поэтому изучение возможности морфофункционального восстановления пораженных вследствие ишемии нервных структур, нейрометаболической стимуляции регенеративных процессов в постишемическом периоде является одной из актуальных проблем медицины. При этом важное значение имеет выбор адекватных и воспроизводимых методов, позволяющих моделировать в экспериментах на животных ишемическое повреждение спинного мозга.

Степень разработанности темы

В настоящее время в качестве экспериментальных моделей ишемии спинного мозга используются в основном три типа – травматическая (компрессионная) [Yeo S.J. et al., 2004, Alluin O. et al., 2011, Волков С.Г., Верещагин Е.И. 2016] модель, связанная с механическим повреждением спинного мозга с помощью пневматических устройств, модель ишемии-реперфузии, воспроизводящая ишемию путем временного перекрытия подключичной артерии или брюшной аорты [Lang-Lazdunski L, Heurteaux C., 2001; Fan L. et al., 2011] и модель фокального фотостимулируемого тромбоза [Watson B. et al., 1985], основанная на том, что при действии света на введенный в кровоток фотосенсибилизированный краситель образуются активные формы кислорода, что увеличивает адгезивность клеток эндотелия, тромбоцитов и приводит к формированию тромба.

Последний метод был признан рядом авторов как наименее инвазивный и воспроизводимый [Labat V., Tomasi S., 2013]. Он был апробирован при проведении исследований на головном и спинном мозге [Watson B.D. et al., 1993, Bunge M.B. et al., 1994].

Но при его использовании на спинном мозге вследствие высокой летальности животных и методических особенностей этот метод не был апробирован при проведении длительных исследований по изучению способности поврежденных ишемией нервных структур к восстановлению.

При ишемическом повреждении нервной системы на фоне снижения метаболической активности нейронов увеличивается проницаемость мембран в отношении ионов натрия и кальция [Luer M. et al., 1996], что с одной стороны повышает осмотическое давление в нейронах, приводящее к набуханию клеток и их дегенерации, а с другой – вызывает выделение нейромедиаторов – глутамата и аспартата, вызывая срабатывание постсинаптических ионных каналов и смещение осмотического равновесия в соседних нейронах. Таким образом запускается так называемый глутаматный каскад [Parsons C et al., 1998], значительно увеличивающий зону исходного повреждения при ишемии. Поэтому агенты, блокирующие потенциалзависимые ионные каналы, а также нормализующие когнитивные функции могут рассматриваться как перспективные средства снижающие степень повреждения нейронов и стимулирующие регенеративные функции в постишемическом периоде [Martin R.L., 1997]. Одним из таких агентов является ноопепт ГВС 111, хорошо зарекомендовавший себя как нейростимулятор регенеративных процессов после вызванной ишемии разных участков головного мозга [Gouliaev A., Senning A., 1994; Takeo S. et al., 1997]. Апробация этого нейростимулятора на спинном мозге с использованием метода фокального фотоиндуцированного тромбоза представлялась весьма важной и перспективной.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является изучение степени поврежденных нейронов, их морфофункционального восстановления и стимуляции нейрорегенеративных процессов с помощью ноопепта ГВС 111 после экспериментального моделирования ишемии грудного отдела спинного мозга крыс методом фокального фотоиндуцированного тромбоза.

Задачи исследования:

1. Воспроизвести ишемию грудного отдела спинного мозга крыс с помощью экспериментальной модели фокального фотоиндуцированного тромбоза.
2. Изучить состояние нейронов в пенумбре экспериментальных животных через 1 сутки, 1 неделю и 2 месяца после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга.
3. Изучить возможность восстановления моторных функций по динамике изменений поведенческих реакций крыс через 1 сутки, 1 неделю, 2 недели, 1 месяц, 1,5 месяца, 2 месяца после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга.
4. Изучить состояние нейронов в пенумбре экспериментальных животных через 1 сутки, 1 неделю и 2 месяца после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга с

использованием ноопепта ГВС 111 в качестве стимулятора нейрорегенеративных процессов.

5. Изучить динамику восстановления моторных функций по изменению поведенческих реакций крыс через 1 сутки, 1 неделю, 2 недели, 1 месяц, 1,5 месяца, 2 месяца после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга с использованием ноопепта ГВС 111 в качестве стимулятора нейрорегенеративных процессов.

Научная новизна

Впервые апробирован метод фокального фотоиндуцированного тромбоза в качестве экспериментальной модели ишемии грудного отдела спинного мозга крыс для изучения динамики восстановления морфофункциональных показателей.

Впервые разработана модификация метода количественной оценки поведенческих реакций экспериментальных животных с частичным парезом конечностей для исследования динамики восстановления моторных функций после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга.

Впервые установлена более высокая сохранность нейронов в пенумбре опытных крыс после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга при использовании ноопепта ГВС 111 в качестве стимулятора нейрорегенеративных процессов.

Впервые обнаружено ускорение восстановления моторных функций опытных крыс после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга при использовании ноопепта ГВС 111 в качестве стимулятора нейрорегенеративных процессов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование носит фундаментально-теоретический характер, в связи с существующей потребностью в адекватных экспериментальных моделях для исследования механизмов повреждения спинного мозга, так и для медицинской практики, в связи с необходимостью поиска эффективных методов коррекции этого состояния, представляющего серьезную медицинскую проблему.

Результаты работы расширяют сведения о возможности восстановления морфофункциональных показателей экспериментальных животных после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга.

Метод фокального фотостимулируемого тромбоза может быть рекомендован применительно к спинному мозгу крыс как модель ишемии для изучения длительного восстановительного периода, а также поиска путей коррекции повреждений.

Полученные результаты могут послужить экспериментальной основой дальнейших исследований по разработке рекомендаций для клинического применения ноопепта ГВС 111 при ишемическом повреждении спинного мозга.

Полученные результаты могут послужить экспериментальной основой рекомендаций для клинического применения методов фармакологической коррекции при ишемическом повреждении спинного мозга в качестве простого доступного средства при оказании первой помощи пострадавшим.

Методология и методы исследования

Методология исследования строилась на сравнительном анализе морфометрических и поведенческих показателей экспериментальных животных с использованием и без использования нейрометаболической стимуляции.

Аппаратурное оформление для моделирования фотоиндуцированного тромбоза включало стереотаксическую установку фирмы "Медикор" для фиксации животных, галогеновую лампу (24V, 250Wt) и отходящих от нее двух световодов диаметром 3 мм [Оборина М.В., и др., 2003].

Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином по Маллори [Лилли Р.Д., 1969], крезильным фиолетовым прочным по методу Ниссля [И.В. Викторов, 1969], люксолевым прочным синим с докрасиванием крезильным фиолетовым прочным [Викторов И.В., 1978], гематоксилином ванадиевым кислым фуксином [Victorov I.V., et al., 2000].

Подсчёт и измерение размеров нейронов, площади их ядрышек проведены в программе «Zeiss Zen» Германия, при помощи камеры AxioCam на световом микроскопе Axio Lab (Carl Zeiss, Германия).

Подсчёт проводился во всех полях зрения, ограниченных рамками квадрата, в пограничной с очагом ишемического повреждения области (пенумбре) и удаленной от очага зоне. Площадь ядрышек мотонейронов определяли на микрофотографиях, полученных с помощью объектива 100×. В каждом образце подсчитывалась площадь ядрышек у клеток без повреждений и количество клеток без повреждений, с обратимыми и необратимыми изменениями.

Полученные данные подвергались статистической обработке, включающей определение оценочных показателей средних значений изучаемых величин, их стандартной ошибки, различия между показателями с использованием параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона, взаимозависимость изучаемых признаков методами корреляционной статистики.

Исследование было одобрено Локальный Этический Комитет ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) протокол № 08-19 от 05.06.2019 г.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Использованный метод фокального фотоиндуцированного тромбоза является адекватной моделью ишемии грудного отдела спинного мозга крыс для изучения динамики

восстановления морфофункциональных показателей.

2. При ишемическом повреждении грудного отдела спинного мозга в пенумбре обнаруживаются нейроны трех категорий – без изменений, с обратимыми изменениями и с необратимыми изменениями.
3. Функциональная активность сохранившихся нейронов в пенумбре у крыс через 2 месяца после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга статистически достоверно выше по сравнению с контролем.
4. Использование ноопепта ГВС 111 в качестве стимулятора нейрорегенераторных процессов после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга снижает летальность, повышает сохранность нейронов и ускоряет восстановление моторных функций.

Внедрение результатов в практику

Полученный в ходе работы основные положения и выводы внедрены в образовательный процесс на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) при обучении студентов по специальностям «Лечебное дело», «Педиатрия», «Стоматология» в рамках федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования (в лекционном процессе, при проведении практических занятий и семинаров, при подготовке учебно-методических материалов).

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов определяется стандартизацией условий содержания лабораторных грызунов, достаточным количеством экспериментальных животных, их рандомизацией с учетом веса, формированием групп сравнения и контроля, адекватными морфологическими и функциональными методами исследования, корректными методами статистического анализа данных.

Апробация результатов диссертационного исследования была проведена на заседании кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), протокол № 04 от «08» ноября 2019 г.

Основные результаты диссертационной работы представлены и обсуждались на трех научных конференциях:

1. Всероссийской конференции «Пластичность и структурно-функциональная взаимосвязь коры и подкорковых образований мозга», ГУ НИИ мозга РАМН 2003 г. Москва
2. 2-ой Научно-практической конференции общества «Спинальный мозг» 2003 г. Москва
3. Международной конференции «Инновационные исследования в области биомедицины» памяти академика В.Н. Ярыгина 28 марта 2019 г. Москва

Личный вклад автора

Автором лично проведено морфологическое и морфометрическое исследование спинного мозга крыс, собран и проанализирован клинический и биопсийный материал, проведена его статистическая обработка, собраны данные по шести функциональным показателям состояния послеоперационных крыс после фототромбоза грудного отдела спинного мозга, написана рукопись диссертации и автореферат. Предложена методика для клинического применения методов фармакологической коррекции при ишемических повреждениях спинного мозга. Автор принимал непосредственное участие в написании статей, тезисов их подготовке к публикации, участвовал в конференциях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Работа выполнена в соответствии с паспортом специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, пункт 5 «Исследование адаптации тканевых элементов к действию различных биологических, физических, химических и других факторов».

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, отражающих полностью содержание диссертации, в том числе 4 в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России (из них 4 статьи в библиографической базе Scopus и 2 Web of Science).

Структура и объем диссертации

Диссертация написана в классическом стиле на 95 страницах, содержит главы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, словарь терминов, библиографический список.

Работа проиллюстрирована 22 рисунками и 9 таблицами. Список литературы включает в себя 150 источников, из них 38 источников на русском языке и 112 – на английском.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Работа выполнена на 150 крысах - самцах линии Вистар, весом от 150 до 250 г.

Исследование проводилось с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На проведение исследований получено разрешение локального этического комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова минздрава России (Сеченовский Университет) (№ 08-19 от 05.06.2019 г.)

Было сформировано 10 основных групп животных.

Группа 1 – интактный контроль – животные, не подвергавшиеся воздействию. Эта группа обозначается как «норма».

Группы 2 – 4 – оперированный контроль – животные, которым была сделана операция и проведена световая обработка, но без введения бенгальского розового. Эти группы обозначаются как «контроль». «Контроль» включал 3 группы, которые использовались для гистологических исследований, включая автоморфометрию через день (группа 2), неделю (группа 3) и 2 месяца (группа 4) после воздействия. Группа 4 использовалась, также, для оценки моторных функций в разные сроки последствий.

Группы 5 – 7 – опытные группы, на которых моделировалась ишемия грудного отдела спинного мозга. Эти группы обозначаются как «опыт 1». «Опыт 1» включал 3 группы, которые использовались для гистологических исследований, включая автоморфометрию через день (группа 5), неделю (группа 6) и 2 месяца (группа 7) после воздействия. Кроме того, группа 7 использовалась для оценки моторных функций в разные сроки последствий.

Группы 8 – 10 – опытные группы, на которых моделировалась ишемия грудного отдела спинного мозга и проводилась нейропротекторная терапия. Эти группы обозначаются как «опыт 2». Они использовались для проведения гистологических исследований, включая автоморфометрию через день (группа 8), неделю (группа 9) и 2 месяца (группа 10) после воздействия. Группа 10 использовалась, также, для оценки моторных функций в разные сроки последствий.

Каждая из указанных основных групп включала не менее 8 особей. Кроме того, в работе использовались дополнительные группы животных для уточнения режима проведения нейропротекторной терапии.

Перед операцией крыс основных (за исключением «нормы») и дополнительных групп наркотизировали инъекцией 3% раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг, интраперитонеально.

В качестве нейростимулятора регенеративных процессов был использован дипептидный ноотроп ГВС 111 или ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролил-глицина, United States Patent, number 5 439 930).

Аппаратурное оформление для моделирования фотоиндуцированного тромбоза включало стереотаксическую установку фирмы "Медикор" для фиксации животных, галогеновую лампу (24V, 250Wt) и отходящих от нее двух световодов диаметром 3 мм [Оборина М.В., и др., 2003].

Перед операцией наркотизированным крысам (группы «опыт 1», «опыт 2») вводили внутривенно (в v. jugularis) 3% раствор красителя Bengal Rose (Sigma, cat. № R 4507) в дозе 40 мг/кг. Кожу спины фиксированных крыс выбривали и обрабатывали 2% раствором иода.

Ножницами производили срединный продольный разрез кожи, раздвигали ее и отсекаровали позвоночник.

Световоды помещали над поверхностью грудного отдела позвоночника на расстоянии 1-2 мм. Время световой экспозиции составляло 30 минут. Для предупреждения термокоагуляционного эффекта поверхность позвоночника во время экспозиции охлаждали физиологическим раствором. Контрольные измерения с помощью микротермистера показали, что температура в области светового пучка не превышала 37,0°C.

После экспозиции рану обрабатывали сухой калийной солью пенициллина, кожу ушивали, шов обрабатывали 2% раствором йода.

Операция группам «контроль» производилась по той же схеме, за исключением внутривенного введения красителя Bengal Rose.

Для нейрогистологического исследования экспериментальных животных под хлоралгидратным наркозом транскардиально перфузировали модифицированным фиксатором Теллесницкого [Лилли Р.Д., 1969] смесью формалин-спирт-уксусная кислота ФУС в пропорции 2:7:1. Спинной мозг извлекали через 4-5 ч, постфиксировали - 1 ч. Затем спинной мозг обезжизнялся нарастающей концентрацией изопропанола [И.В. Викторов, С.С. Пашин, 2003]. После проводки по спиртам спинной мозг парафинировали. Парафиновые блоки нарезали толщиной 6-8 мкм и монтировали на стекла, депарафинизировали в ксилоле, промывали в абс. этаноле. Депарафинированные срезы окрашивали:

1. Гематоксилином и эозином по Маллори (Лилли Р.Д., 1969).

2. Крезилковым фиолетовым прочным по методу Ниссля.

Окрашивали крезилковым фиолетовым прочным (100 мг крезилового фиолетового, 100 мл ацетатного буфера рН 3.4 (130 мг ацетата натрия, 1.2 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл дистиллята) [Викторов И.В., 1969; Викторов И.В., Барсков И.В., 1993].

3. Люксолевым прочным синим с докрасиванием крезилковым фиолетовым прочным, метод комбинированного окрашивания миелиновых волокон и клеток мозга [И.В. Викторов, 1978].

4. Гематоксилином ванадиевым кислым фуксином, позволяющим выявлять как нормальные, так и ишемически поврежденные нейроны, а также дифференцировать степень ишемического повреждения нейронов [Victorov I.V., 2000].

Подсчёт и измерение размеров нейронов, площади их ядрышек проведены в программе «Zeiss Zen» Германия, при помощи камеры AxioCam на световом микроскопе Axio Lab (Carl Zeiss, Германия).

Подсчёт проводился во всех полях зрения, ограниченных рамками квадрата, в пограничной с очагом ишемического повреждения области (пенумбре) и удаленной от очага зоне. Площадь ядрышек мотонейронов определяли на микрофотографиях, полученных с помощью объектива 100×. В каждом образце подсчитывалась площадь ядрышек у клеток без

повреждений и количество клеток без повреждений, с обратимыми и необратимыми изменениями.

Для количественной и объективной оценки поведенческих реакций у животных в данной работе была использована модификация различных методов. Оценка состояния и поведения животных проводилась по интегральному показателю, а критериями для его установления служили несколько параметров состояния животных, регистрируемых в ходе исследований. Каждому критерию присваивался определенный балл (табл. 1).

Таблица 1 - Шкала оценки поведенческих реакций у крыс по интегральному показателю в баллах

Критерии оценки	Балл
Отсутствие двигательной активности и рефлекса позы	0
Отсутствие двигательной активности и реакции на раздражитель задних конечностей и хвоста, но сохранение рефлекса позы	1
Двигательная активность только за счет передних конечностей, слабая реакция на раздражитель задних конечностей и хвоста	2
Имитация восстановления функций одной из задних конечностей	3
Имитация восстановления функций обеих конечностей	4
Восстановление функции задних конечностей, но сниженная реакция на тепловой раздражитель (более 8 сек.)	5
Восстановление скорости реакции на тепловой раздражитель (8 сек. и менее)	6

Проводилась оценка продолжительности пареза мочевого пузыря после операции. Нейростимулирующее действие ГВС-111 (ноопепта) изучалось при его внутривенном введении экспериментальной группе животных (опыт 2) в течение 10 дней в дозе 0,5 мг/кг/день. При этом первая доза ноопепта вводилась через 1 час после окончания световой экспозиции.

Полученные данные подвергались статистической обработке, включающей определение оценочных показателей средних значений изучаемых величин, их стандартной ошибки, различия между показателями с использованием параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона, взаимозависимость изучаемых признаков методами корреляционной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Непосредственно после операции, животные «опытных» и «контрольных» групп мало отличались, были заторможены. Однако, у «контрольных» животных двигательная активность быстро восстанавливалась, в то время как «опытные» животные в течение недели после операции практически полностью теряли подвижность, многие особи погибали. Летальность у животных

групп «опыт 1» составляла 45-55%. У выживших в течение первой недели «опытных» животных происходило медленное восстановление двигательной активности.

Гистологические исследования в постишемическом периоде

На гистологических срезах на 1-е сутки после вызванной ишемии выявляется фокальный участок с признаками начинающегося некроза, который почти не окрашивается (рис. 1). В этот период в пограничной с некротическим очагом зоне – в области перифокального повреждения (пенумбре), помимо отека, отмечаются острые изменения нейронов: острое набухание, кариоцитоллиз, клетки-тени, встречаются также единичные клетки с ишемическим изменением (рис. 2).

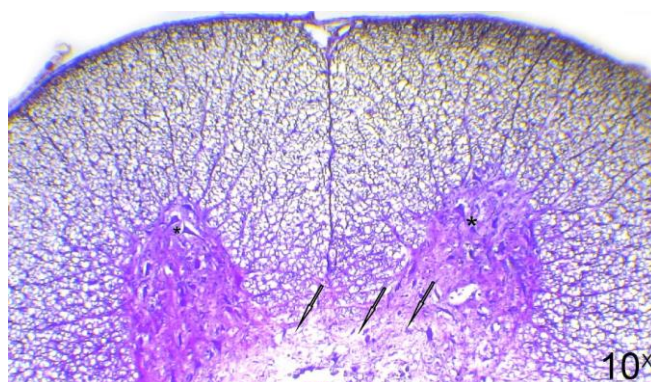


Рисунок 1 - Острые изменения в фокальной зоне некроза (фотоиндуцированный тромбоз)

1.- гиперхромные нейроны угловатой формы с перицеллюлярным отеком (звездочка). 2.- фокальный участок с признаками начинающегося некроза, который почти не окрашивается (стрелки). Окраска крезиловым фиолетовым прочным по методу Ниссля. Увеличение 10X

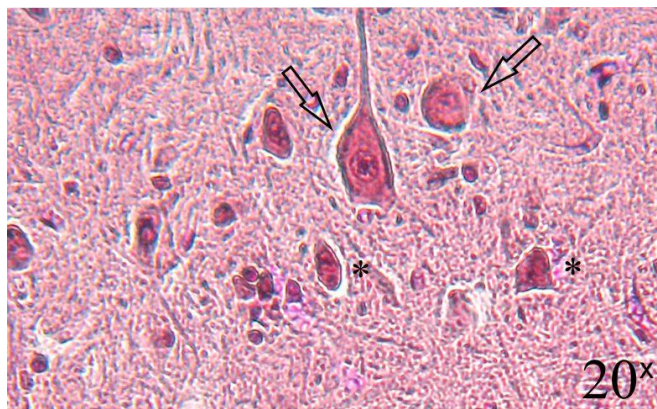
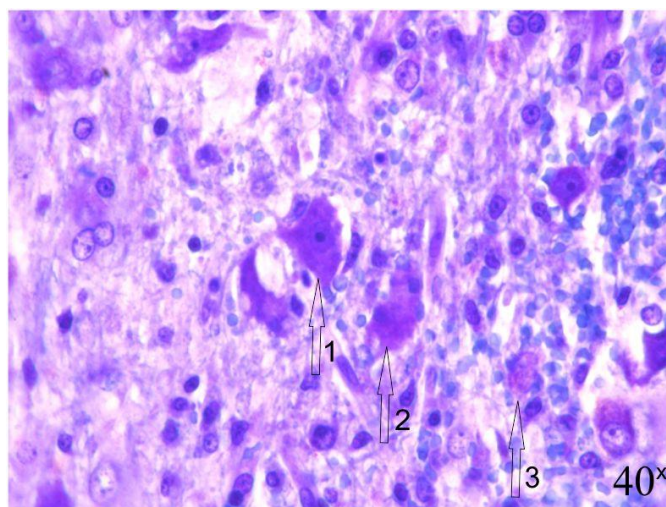


Рисунок 2 - Изменения нейронов (в области перифокального повреждения) – пенумбра (фотоиндуцированный тромбоз)

1.- гиперхромные нейроны с перицеллюлярным отеком (звездочка). 2.- нейроны, с начальными явлениями хроматолиза. Вещество Ниссля не выявляется, наблюдается отечность цитоплазмы, но ядро и ядрышко занимают центральное положение. Ядро светлое с преобладанием эухроматина. Клетки с перицеллюлярным отеком (стрелки). Окраска гематоксилин ванадиевым кислым фуксином. Увеличение 20X

Через неделю после вызванной ишемии в пенумбре начинаются репаративные процессы. К ишемически страдающим нейронам устремляются астроциты, выполняющие функции глиальных макрофагов. При этом выявляется пролиферация и гипертрофия астроцитов. Астроциты окружают страдающий нейрон и формируют первичные глиальные розетки. Вторичные глиальные розетки или глиальные зернистые шары образованы скоплением астроцитарной глии на месте погибшего нейрона. Глиальные макрофаги внедряясь в зону некроза, запускают процессы рассасывания некротизированной ткани (рис.3).

В удаленной от очага зоне (окружающей пенумбру) наряду с погибшими клетками присутствуют нормальные неизмененные нейроны (рис. 4), а также гиперхромные нейроны, которые на более поздних сроках либо восстанавливаются, либо погибают.



**Рисунок 3 - Проплиферация и гипертрофия астроцитов - пенумбра
(фотоиндуцированный тромбоз)**

1.- начальный этап формирования первичной глиальной розетки. Вокруг ишемически измененного нейрона гиперхромной окраски с темным пикнотичным ядром скопление астроцитов.

Начальная стадия фагоцитоза гибнущего нейрона (стрелка 1). 2.- последующая стадия фагоцитоза, когда контуры нейрона расплывчатые, ядро не выявляется, глия расположена не только рядом, но и над самим нейроном (стрелка 2). 3.- вторичная глиальная розетка, на месте погибшего нейрона, его клеточной тени, скопление десятка астроцитов, которые завершают фагоцитоз (стрелка 3). Окраска Люксолевым прочным синим с докрасиванием крезидовым фиолетовым прочным. Увеличение 40X

В очаге некроза начинает формироваться глиально-соединительнотканый рубец, окончательное формирование которого происходит к концу третьей недели после ишемического повреждения.

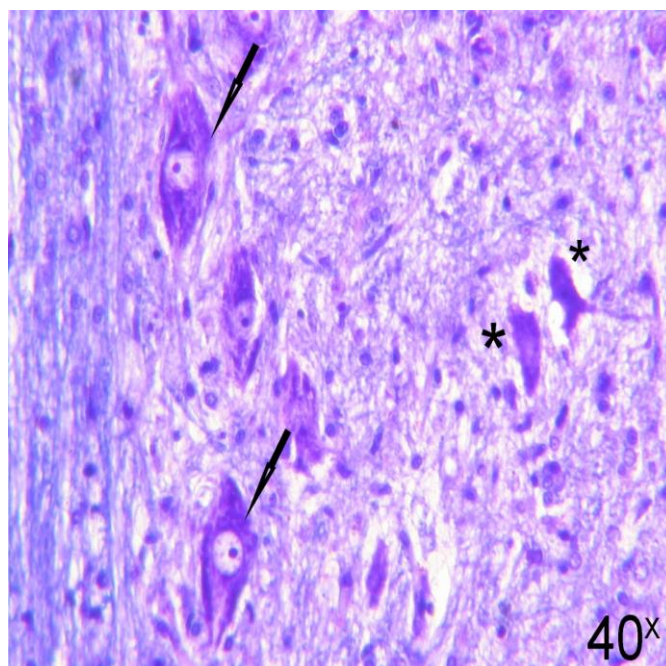


Рисунок 4 - В удаленной от очага зоне, на 6 сутки после операции (фотоиндуцированный тромбоз)

1.- гиперхромные нейроны, с перичеселлюлярным отеком (звездочки). 2.- нормальные нейроны, с центрально расположенными светлыми ядрами, в цитоплазме которых хорошо выражены глыбки хроматина (стрелки). Окраска Люксолевым прочным синим с докрашиванием крезильовым фиолетовым прочным. Увеличение 40X

Соотношение клеток с разной степенью повреждения и разных зонах представлены в табл. 2-4. Как следует из таблиц, на первые сутки после воздействия заметные изменения гистологических показателей отмечались только непосредственно в зоне некротического очага. На шестые сутки последствия, на фоне выраженной патологии со стороны поведенческих реакций, наблюдался пик изменений гистологических показателей во всех исследуемых зонах, но наибольшие повреждения клеточных структур выявлены в зоне очага и в пенумбре.

Таблица 2 - Количество клеток (в %) с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза в зоне некротического очага

Степень повреждения клеток	Сроки наблюдения после экспозиции		
	1 сут.	1 нед.	2 мес.
Без изменений	67,6±2,6	3,9±1,0	-
Обратимые изменения	14,8±1,7	9,5±1,6	-
Необратимые изменения	17,6±1,4	86,6±2,0	-

Таблица 3 - Количество клеток (в %) с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза в зоне пенумбры

Степень повреждения клеток	Сроки наблюдения после экспозиции		
	1 сут.	1 нед.	2 мес.
Без изменений	84,2±3,3	11,8±1,3	30,0±1,8
Обратимые изменения	8,1±1,7	22,5±1,6	28,7±1,7
Необратимые изменения	7,7±2,5	65,7±1,4	41,3±3,0

Таблица 4 - Количество клеток (в %) с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза в удаленной от очага зоне

Степень повреждения клеток	Сроки наблюдения после экспозиции		
	1 сут.	1 нед.	2 мес.
Без изменений	97,5±1,6	71,3±2,0	82,7±2,4
Обратимые изменения	1,3±0,9	12,7±1,3	6,9±1,2
Необратимые изменения	1,2±1,1	16,0±1,8	10,4±1,6

Через 2 месяца после экспозиции относительное число неповрежденных клеток в граничащей с очагом зоне достоверно повышалось, но было значительно ниже нормы. В зоне очага к этому времени был сформирован глиально-соединительнотканый рубец.

Для оценки функциональной активности нейронов были проведены измерения площади ядрышек в удаленной от очага повреждения зоне. Динамика данного показателя представлена в табл. 5.

Таблица 5 - Изменения размера ядрышек нейронов (мкм²) в разные сроки после воздействия

Группы животных	Сроки наблюдения после экспозиции		
	1 сут.	1 нед.	2 мес.
«Контроль»	12,1±2,3	11,3±2,8	12,0±2,8
«Опыт 1»	11,7±4,3	7,5±2,6	17,1±3,1

Как видно из таблицы через неделю после воздействия площадь ядрышек нейронов «опытной» группы была достоверно ниже, чем в «контроле» ($p < 0,05$), что позволяет судить о значительном снижении функциональной активности нейронов. На это указывает также базофильная окраска ядер нейронов (преобладание гетерохроматина) в этот период. Спустя 2 месяца после воздействия размеры ядрышек в группе «опыт 1» становятся значительно больше

по сравнению с «контролем» ($p < 0,01$), а ядра освещаются. Обнаруживаются нейроны с двумя ядрышками.

Исследование изменений моторных функций в постишемическом периоде

Использование интегрального показателя позволило количественно представить динамику изменений поведения животных в разные сроки наблюдения и провести статистическую обработку полученных данных (табл. 6). Наиболее выраженные изменения моторных функций наблюдались через неделю после ишемического воздействия. У ложнооперированных животных заметных изменений моторных функций в те же сроки не наблюдалось. В таблице 6 звездочками отмечены данные, статистически достоверно отличающиеся от контроля (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$).

Таблица 6 - Динамика изменений интегрального показателя поведенческих реакций крыс до (фон) и после операции по моделированию фотоиндуцированного тромбоза спинного мозга (средние данные)

Группы животных	фон	Время после воздействия					
		1 сут.	1 нед.	2 нед.	1 мес.	1,5 мес.	2 мес.
Контроль	5,8±0,4	4,4±0,5	5,5±0,5	5,8±0,4	5,8±0,4	5,7±0,5	5,8±0,4
Опыт 1	5,6±0,5	4,1±0,6	0,8±0,6**	1,7±0,5*	2,9±0,6*	4,2±0,9	5,0±0,7

Проведенное исследование моторных функций в разные сроки после фотоиндуцированного тромбоза сосудов грудного отдела спинного мозга выявили преходящие изменения моторных функций при тестировании ишемизированных животных.

Нейропротекторная коррекция ишемического повреждения

Общая картина поведенческих реакций крыс после моделирования фотоиндуцированного тромбоза с использованием ноопепта («опыт 2») была сходной с тем, что наблюдалось после аналогичного воздействия без использования нейропротектора («опыт 1»). Однако выявленные у крыс патологические изменения носили менее выраженный характер, летальность животных сократилась до 7-14%, а восстановление функций происходило почти в два раза быстрее. Следует отметить, что по данным предварительных исследований терапевтический эффект ноопепта тем выше, чем меньше временной интервал между световой экспозицией и введением первой дозы препарата. Учитывая то, что в реальных условиях, например пострадавшему от спинальной травмы медицинская помощь не может быть оказана мгновенно, первая доза препарата в основной серии исследований, как указано выше, всегда вводилась через 1 час после световой экспозиции.

В таблице 7 представлена динамика изменений поведения животных группы «опыт 2» в сравнении с группой «опыт 1» и контролем. Как следует из таблицы, на первую неделю последействия приходился пик изменения поведенческих показателей в группе «опыт 2», но их

количественная характеристика в среднем примерно в три раза выше, чем у животных группы «опыт 1», хотя можно констатировать лишь тенденцию к различию этого показателя (различия статистически недостоверны).

Таблица 7 - Динамика изменений интегрального показателя поведенческих реакций крыс до (фон) и после операции по моделированию фотоиндуцированного тромбоза спинного мозга без использования (опыт 1) и с использованием (опыт 2) ноопепта (средние данные)

Группы животных	фон	Время после воздействия					
		1 сут.	1 нед.	2 нед.	1 мес.	1,5 мес.	2 мес.
Контроль	5,8±0,4	4,4±0,5	5,5±0,5	5,8±0,4	5,8±0,4	5,7±0,5	5,8±0,4
Опыт 1	5,6±0,5	4,1±0,6	0,8±0,6	1,7±0,5	2,9±0,6	4,2±0,9	5,0±0,7
Опыт 2	5,6±0,5	4,4±0,7	2,7±0,7	4,1±0,7	5,1±0,7	5,5±0,5	5,7±0,5

Уже через 2 недели восстановительного периода повышение интегрального показателя у группы «опыт 2» становится статистически значимым по отношению к группе «опыт 1» и приближается к «контролю». Спустя еще две недели данный показатель практически не отличается от контроля и фона.

ГВС-111 не только снижал степень нарушения моторных функций, летальность, но и обеспечивал большую сохранность ткани спинного мозга крыс группы «опыт 2» в очаге ишемического повреждения (рис. 5).

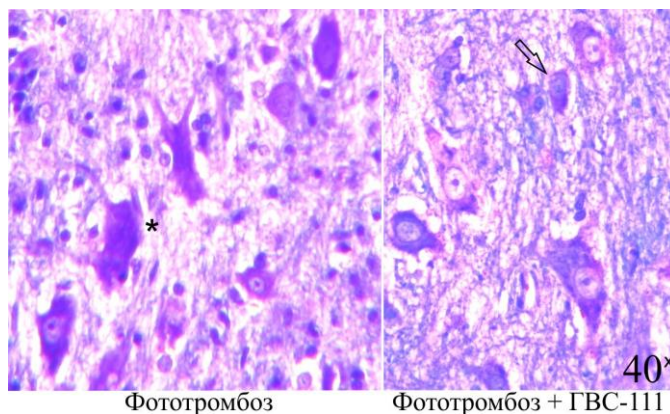


Рисунок 5 - Ишемическое повреждение нейронов (фотоиндуцированный тромбоз, фотоиндуцированный тромбоз + нейростимулирующий эффект ноопепта)

1.- нейрон, в котором выявляется темное сморщенное пикнотичное ядро (стрелка). 2.- нейрон, тело сморщено, деформированно, ядро не выявляется (звездочка). Окраска Люголем с докраской крезолом фиолетовым.

Увеличение 40X

Анализ гистологических препаратов показал, что количество ацидофильных и гиперхромных нейронов в очаге ишемического повреждения и в окружающей очаг пенумбре достоверно меньше у животных, которым вводился ГВС-111. В то время как в контрольной группе очаг

фокального ишемического повреждения занимал почти весь поперечник спинного мозга. Полученные данные свидетельствуют о том, что ГВС-111 препятствует постишемическим деструктивным процессам в фокальном ишемическом очаге, индуцированном фототромбозом.

При этом наблюдается достаточно стабильная корреляция между нормализацией поведенческих реакций и сохранностью нейронов в зоне ишемического поражения (табл. 8).

Как следует из табл. 8, через неделю после экспозиции относительное количество неповрежденных нейронов в пенумбре у животных, которым вводился ноопепт, было значительно выше суммарного относительного количества нормальных и обратимо измененных нейронов у животных, не получавших нейростимулятор.

Таблица 8 - Количество клеток (в %) в зоне пенумбры с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза у крыс групп «опыт 1» и «опыт 2»

Степень повреждения клеток	Группы животных	Сроки наблюдения после экспозиции		
		1 сут.	1 нед.	2 мес.
Без изменений	Опыт 1	84,2±3,3	11,8±1,3	30,0±1,8
	Опыт 2	87,2±2,8	44,1±3,1	72,9±3,0
Обратимые изменения	Опыт 1	8,1±1,7	22,5±1,6	28,7±1,7
	Опыт 2	8,4±1,6	37,3±2,8	15,1±1,9
Необратимые изменения	Опыт 1	7,7±2,5	65,7±1,4	41,3±3,0
	Опыт 2	5,2±2,0	18,6±2,8	12,0±1,8

Менее выраженными были и изменения функциональной активности нейронов у животных группы «опыт 2», оцениваемые по площади ядрышек (табл. 9).

Таблица 9 - Сравнительная оценка динамики изменений размеров ядрышек нейронов (мкм²) разных групп животных

Группы животных	Сроки наблюдения после экспозиции		
	1 сут.	1 нед.	2 мес.
«Контроль»	12,1±2,3	11,3±2,8	12,0±2,8
«Опыт 1»	11,7±4,3	7,5±2,6	17,1±3,1
«Опыт 2»	12,3±2,9	9,8±3,1	14,9±6,0

Как видно из таблицы, через неделю и 2 месяца после воздействия площадь ядрышек нейронов в группе «опыт 2» не достоверно отличалась от «контроля», обнаруживая лишь тенденцию к изменению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенной работы показали, что метод фокального фотоиндуцированного тромбоза является не только адекватной моделью ишемии спинного мозга, но, кроме того, обладает необходимой для экспериментальных исследований воспроизводимостью, т.к.

обеспечивает высокую степень локализации очага ишемического повреждения в серии опытов. У выживших после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга экспериментальных животных выявлено значительное повреждение нейронов в зоне, окружающей очаг ишемии. В структуре сохранившихся нейронов отмечен повышенный размер ядрышек, что позволяет судить о высокой функциональной активности клеток и преобладании компенсаторных процессов в восстановлении двигательных функций. При использовании в качестве нейростимулятора регенерации поврежденной нервной ткани ноопепта ГВС-111 наблюдалось снижение летальности, степени повреждения нейронов и ускорение восстановления моторных функций у животных, что делает данный препарат перспективным для разработки методов коррекции постишемических нарушений различной этиологии в структурах спинного мозга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано использовать автоморфометрический метод, позволяющий повысить эффективность доклинических исследований лекарственных препаратов и изучения динамики восстановления морфофункциональных показателей.
2. Рекомендовано применение использованного метода фотоиндуцируемого тромбоза в качестве экспериментальной модели при проведении доклинических исследований лекарственных препаратов и анализа механизмов ишемического повреждения грудного отдела спинного мозга и восстановления функционального состояния ЦНС в постишемическом периоде.
3. Полученные результаты могут послужить экспериментальной основой рекомендаций для клинического применения методов фармакологической коррекции при ишемическом повреждении спинного мозга в качестве простого доступного средства при оказании первой помощи пострадавшим.

ВЫВОДЫ

1. Метод фокального фотоиндуцированного тромбоза является адекватной и воспроизводимой моделью для изучения морфологических и функциональных изменений после локального повреждения грудного отдела спинного мозга.
2. У экспериментальных животных, выживших после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга, наблюдается медленное восстановление моторных функций на фоне сниженного количества нейронов и их повышенной активности, что предполагает преимущественно компенсаторные механизмы в процессе восстановления.
3. Использование ноопепта (ГВС-111) в постишемическом периоде снижает летальность и повышает сохранность нейронов экспериментальных животных.
4. Ноопепт (ГВС-111) ускоряет восстановление моторных функций экспериментальных животных после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга.

5. Результаты проведенных исследований позволяют рассматривать ноопепт (ГВС- 111) в качестве нейростимулятора регенеративных процессов после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оборина М.В., **Пашин С.С.**, Барсков И.В., Викторов И.В. Морфологическое исследование ишемического повреждения спинного мозга крыс на модели фотоиндуцированного тромбоза. Материалы Всероссийской конференции «Пластичность и структурно-функциональная взаимосвязь коры и подкорковых образований мозга», ГУ НИИ мозга РАМН, 2003, с. 67.

2. Оборина М.В., **Пашин С.С.**, Барсков И.В., Викторов И.В. Моделирование ишемического повреждения спинного мозга крыс методом фотоиндуцированного тромбоза (морфологическое исследование). В сб.: Материалы 2-й научно-практической конференции общества «Спинной мозг», М., 2003, с. 39-40.

3. **С.С. Пашин** и И.В. Викторов. Морфофункциональные изменения в спинном мозгу крыс после фокального фототромбоза. **Морфология, Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, оригинальные исследования.**, 2008, т. 133, №1, с. 35-38. / **Pashin S & Viktorov I.** Morpho-functional changes in the spinal cord of rats after focal photothrombosis. **Morfologiia** (Saint Petersburg, Russia) (2008) 133(1) 35-38.

4. **S. S. Pashin & I. V. Viktorov.** Morpho-functional changes in the spinal cord of rats after focal photothrombosis. **Neuroscience and Behavioral Physiology** volume 39, pages203–206(2009).

5. Дубовая Т.К., Лобов М.А., Древаль А.А., Пашина Н.Р., **Пашин С.С.**, Куприн А.В., Балевиц С.Б., Князев А.В., Пантелеева М.В. Гисто- и цитоархитектоника гиппокампа неполовозрелых крыс на фоне введения пропофола и мексидола. **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**, 2010, Том 149, № 4, с 457-460. / Т. К. Dubovay, М. А. Lobov, А. А. Dreval, N. R. Pashina, **S. S. Pashin**, А. V. Kuprin, S. B. Bolevich, А. V. Knazev & М. V. Panteleeva. Histo- and Cytoarchitectonics of the Hippocampus in Young Rats Injected with Propofol and Mexidol. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine** volume 149, pages471–473(2010).

6. В.Н. Ракитский, **С.С. Пашин**. Нейропротекторное действие ноопепта на модели фокального ишемического повреждения спинного мозга. **Токсикологический вестник.**, 2016, т. 137, №2, с. 37-40.

7. **Пашин С.С.**, Пашина Н.Р., Древаль А.А. Использование интегрального показателя поведения опытных животных при моделировании ишемических повреждений ЦНС. В сб. тезисов: Международная конференция «Инновационные исследования в области биомедицины» памяти академика В.Н. Ярыгина 28 марта 2019г. Москва, 2019, с. 27-28.

8. **С.С. Пашин**, С.Л. Кузнецов, Н.Р. Пашина, Д.А. Цомартова, Е.В. Черешнева, М.Ю. Иванова. Использование метода фокального фотоиндуцированного тромбоза при

моделировании ишемии спинного мозга. **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**, 2019, Том 168, № 10, с 517-518. / **S. S. Pashin**, S. L. Kuznetsov, N. R. Pashina, D. A. Tsomartova, E. V. Cheresheva & M. Yu. Ivanova. Application of Focal Photoinduced Thrombosis for Modeling Spinal Cord Ischemia. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine** volume 168, pages 525–528 (2020).

Список использованных сокращений и условных обозначений:

1. **АМРА** – альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионат
2. **АМРА-рецептор** – рецептор глутамата, селективно связывающий АМРА
3. **АМФ** – аденозинмонофосфат
4. **АТФ** – аденозинтрифосфат
5. **BDNF** – мозговой нейротрофический фактор
6. **ВАК** - возбуждающие аминокислоты
7. **CNTF** – цилиарный нейротрофический фактор
8. **ДАГ** – 1,2-диацилглицерин
9. **ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
10. **ИФ3** – инозит-1,4,5-трифосфат
11. **NMDA** – N-метил-D-аспартат
12. **NMDA-рецептор** – рецептор глутамата, селективно связывающий NMDA
13. **ПОЛ** – перекисное окисление липидов
14. **СОД** – супероксиддисмутаза
15. **ЦНС** - центральная нервная система