ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ) МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Кузнецов Сергей Львович

Москва - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13

1.1. Моделирование ишемии спинного мозга in vivo 13

1.1.1. Модели общей ишемии 13

1.1.2. Модели фокальной ишемии 14

1.1.2.1. Травматические (компрессионные) модели 14

1.1.2.2. Модель фотоиндуцированного тромбоза 14

1.2. Патоморфологические изменения ткани спинного мозга при экспериментальной ишемии 16

1.3. Патогенез травматического повреждения спинного мозга 18

1.3.1. Некротическое поражение нервной ткани при ишемии 19

1.3.1.1. Деструктивные механизмы, приводящие к гибели нейронов 19

1.3.1.2. Перекисное окисление липидов в ЦНС 22

1.3.2. Апоптоз как возможный тип гибели нейронов при ишемии 24

1.3.3. Вторичные патологические изменения 25

1.4. Основные этапы восстановления нарушенных функций спинного мозга 26

1.4.1. Регенеративные пути постишемического восстановления 26

1.4.2. Компенсаторные механизмы восстановительных процессов 27

1.5. Методы коррекции ишемического повреждения спинного мозга 28

1.5.1. Нефармакологические нейропротекторы 28

1.5.1.1. Гипотермия 28

1.5.1.2. Хирургическая коррекция и трансплантация 29

1.5.2. Фармакологические нейропротекторы 30

1.5.2.1. Средства, действующие на рецепторы возбуждающих аминокислот 31

1.5.2.2. Блокаторы кальциевых каналов 33

1.5.2.3. Антиоксиданты 33

1.5.2.4. Ингибиторы образования свободных радикалов 34
1.5.2.5. Ферментная инактивация свободных радикалов 34
1.5.2.6. Неферментные ловушки свободных радикалов 35
1.5.2.7. Ганглиозиды 30
1.5.2.8. Нейрометаболические стимуляторы (ноотропы) 37

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 39
2.1. Моделирование фотоиндуцированного тромбоза 40
2.2. Методы исследования спинного мозга животных после фокальной ишемии 43
2.2.1. Нейроморфологическое исследование 43
2.2.2. Исследование изменения непроизвольных, врожденных реакций для анализа нарушений моторных функций 49

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 52
3.1. Морфологическое исследование 52
3.1.1. Макроскопическая характеристика фокальных очагов ишемического повреждения спинного мозга 52
3.1.2. Гистологическая характеристика фокальных очагов ишемического повреждения спинного мозга 53
3.2. Изменение моторных функций при фокальном ишемическом повреждении грудного отдела спинного мозга 65
3.3. Фармакологическая коррекция последствий ишемического повреждения грудного отдела спинного мозга 67
3.3.1. Нейростимулирующий эффект ноопепта 67

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ 72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 77
ВЫВОДЫ 77
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 78

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 79
СПИСОК ТЕРМИНОВ 79
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК 80
БЛАГОДАРНОСТЬ 95

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного 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 [138; 144; 91; 130].

Нарушения, возникающие в структуре спинного мозга при ишемии, могут стать причиной частичного или полного паралича конечностей и других органов, вплоть до летального исхода [100; 145].

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 [82]. 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. [70].

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 исследования

В настоящее время в качестве экспериментальных моделей ишемии спинного мозга используются в основном три типа – травматическая (компрессионная) [147; 39; 12] модель, связанная с механическим повреждением спинного мозга с помощью пневматических устройств, модель ишемии-реперфузии, воспроизводящая ишемию путем временного перекрывания

подключичной артерии или брюшной аорты [81; 62] и модель фокального фотостимулируемого тромбоза [140], основанная на том, что введенный в кровоток фотосенсибилизированный краситель под действием света вызывает образование активных форм кислорода, повышающих адгезивность клеток эндотелия, тромбоцитов, что приводит к формированию тромба.

Последний метод был признан рядом авторов как наименее инвазивный и воспроизводимый [80]. Он был апробирован при проведении исследований на головном и спинном мозге [141; 46]. 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 не фоне снижения метаболической активности нейронов увеличивается проницаемость мембран в отношении ионов натрия и кальция [88], что с одной стороны повышает осмотическое давление в нейронах, приводящее к набуханию клеток и их деградации, 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 [110], значительно увеличивающий зону исходного повреждения при ишемии. Поэтому агенты, блокирующие потенциалзависимые ионные каналы, а также нормализующие моторные функции могут рассматриваться как перспективные средства снижающие степень повреждения нейронов и стимулирующие регенеративные функции в постишемическом периоде [93]. Одним из таких агентов является ноопепт ГВС 111, хорошо зарекомендовавший себя как нейростимулятор регенеративных процессов после вызванной ишемии разных участков головного мозга [65; 131]. 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 повреждения 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.

Научно-практическая и теоретическая 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 [22; 26].

Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином по Маллори [19], крезиловым фиолетовым прочным по методу Ниссля [7], люксолевым прочным синим с докрашиванием крезиловым фиолетовым прочным [8], гематоксилином ванадиевым кислым фуксином [136].

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) (рис. 10).

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.

Достоверность результатов и апробация работы

Достоверность результатов исследования обеспечивалась стандартизацией условий содержания лабораторных грызунов, достаточным для статистической обработки количеством экспериментальных животных, жестким отбором их по возрасту и весу, использованием многократно апробированных на практике гистологических методов, аппаратуры и традиционных методов статистики.

Апробация диссертации 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 «Спинной мозг» 2003 г. Москва
3. Международной конференции «Инновационные исследования в области биомедицины» памяти академика В.Н. Ярыгина 28 марта 2019 г. Москва

Внедрение результатов исследования в практику

Полученные 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).

Личный вклад автора в проведенное исследование

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 работы

Результаты данной работы представлены в 7 публикациях, из них 4 статьи в журналах из списка ВАК, 4 БД Scopus и 2 Web of Science.

Объем и структура 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, проиллюстрирована 22 рисунками и 9 таблицами. Список литературы включает 150 источников, из них 38 источника на русском языке и 112 – на английском.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Ишемия спинного мозга, обозначаемая как клинический «синдром ишемии спинного мозга» [102], может развиваться при спинальной травме, опухолях спинного мозга, смещении межпозвоночных дисков, острой остановке сердца с последующей реанимацией, при операциях на открытом сердце, стенозе брюшной аорты и ее торакоабдоминальном хирургическом лечении [138; 144; 145; 91; 100; 130].

1.1. Моделирование ишемии спинного мозга in vivo

Экспериментальные модели острого нарушения кровоснабжения спинного мозга можно разделить на две основные группы: общей и фокальной ишемии.

1.1.1. Модели общей ишемии

Рядом авторов разработаны модели, основанные на различных методах эмболизации сосудистого русла [75]. Эти модели, основанные на интраартериальной инъекции всевозможных эмболов, несмотря на кажущуюся простоту их воспроизведения, используются редко, поскольку они дают довольно большой разброс по размеру и нестандартность локализации ишемических повреждений, что является существенным недостатком, который не может не учитываться при оценке достоверности полученных на таких моделях результатов.

При моделировании общей ишемии спинного мозга часто используют закрытие подключичной артерии и брюшной части аорты ниже уровня почечных артерий [81; 62]. Эти методы в литературе обычно обозначают как модели ишемии-реперфузии. При этом очаги ишемии могут возникать в различных областях не только спинного мозга, но и других органов, что также не способствует воспроизводимости получаемых результатов. Кроме того, эти модели требуют сложной, продолжительной (более часа), полостной операции, которую саму по себе можно рассматривать как существенный фактор воздействия. Поэтому понятно стремление исследователей по поиску менее

инвазивных моделей, позволяющих воспроизводить ишемию в локальной области.

1.1.2. Модели фокальной ишемии

1.1.2.1. Травматические (компрессионные) модели

Травматические модели повреждения спинного мозга использовались еще с начала 20 века. Первоначально это были примитивные модели, суть которых заключалась в сбрасывании гирь с определенной высоты в область спины экспериментальных животных. Впоследствии эти модели были усовершенствованы с помощью пружинных, пневматических устройств и стандартизированы [42; 4; 147; 40; 39; 12]. Компрессионные методы позволяют достаточно точно воспроизводить локальную спинальную травму, но рассматривать их в качестве экспериментальной модели ишемии спинного мозга можно лишь условно, т.к. кроме ишемии эти методы вызывают механические повреждения спинного мозга, спинномозговых нервов, ганглиев, костной ткани, внутренних органов.

1.1.2.2. Модель фотоиндуцированного тромбоза

Модель фотоиндуцированного тромбоза основана на том, что введенный в кровоток фотосенсибилизированный краситель (Bengal rose) под действием света вызывает образование активных форм кислорода, что приводит к формированию тромба, перекрывающего просвет сосуда. Данная модель впервые была апробирована на головном мозге крыс [140]. Позже эта модель была использована применительно к спинному мозгу крыс [141]. Соответствие данной модели реальному ишемическому повреждению головного и спинного мозга было подтверждено исследованиями с использованием световой и электронной микроскопии [46; 134; 64]. Модель фотоиндуцированного тромбоза была признана рядом авторов минимально инвазивной и воспроизводимой [32; 80]. Методика экспериментально вызванного ишемического повреждения спинного мозга при помощи модели фотоиндуцированного тромбоза отличается

технической простотой, но при этом она может рассматриваться максимально приближенной к клиническим формам ишемического повреждения спинного мозга. Однако при проведении исследований 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 воспроизведении модели фотоиндуцированного тромбоза хирургические манипуляции, осуществляемые под наркозом, минимальны и сводятся к разрезу кожи и удалению мышечной и соединительной ткани над позвоночником на ограниченном участке, животному предварительно внутривенно вводится бенгальский розовый, после чего к интактному спинному мозгу подводится локальный световой пучок от лампы накаливания или лазерный луч с длиной световой волны, равной 560 нм [140; 141]. При действии света на циркулирующий в кровотоке фоточувствительный краситель образуются активные формы кислорода, которые инициируют повреждение эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, агрегацию и адгезию тромбоцитов, формирование тромба, что и приводит к последующему развитию ишемического повреждения питаемого этими сосудами участка нервной ткани. При этом клетки эндотелия повреждаются исключительно в тех сосудах, до которых доходит возбуждающий свет, поэтому объем первичного ишемического поражения соизмерим с размером освещаемой области (рис. 1).

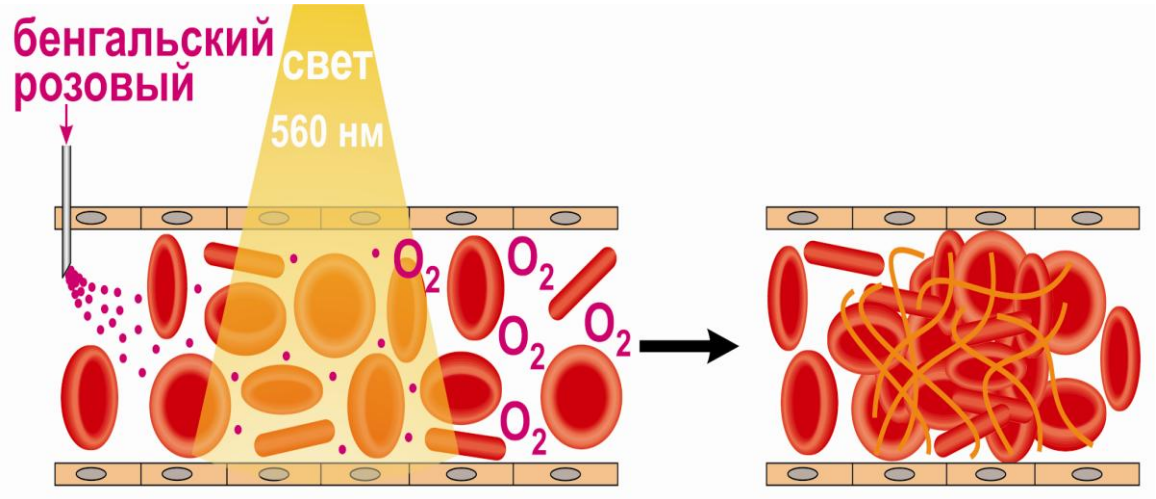


Рис. 1. Схема фотоиндуцированного тромбирования кровеносного сосуда.

С помощью данного метода в локальной зоне спинного мозга может быть воспроизведен очаг ишемического повреждения, в котором нейроны погибают, а на месте очага постепенно формируется рубец. Вокруг очага гистологически выявляется зона перифокального повреждения – пенумбра (от лат. penumbra – полутень), где кроме нейронов с необратимыми изменениями присутствуют неповрежденные нервные клетки, а также гиперхромные – имеющие умеренные повреждения, но сохраняющие потенцию к восстановлению [41].

1.2. Патоморфологические изменения ткани спинного мозга при экспериментальной ишемии.

Гистологические исследования, выполненные на моделях как общей, так и фокальной ишемии показывают, что патоморфологические изменения ткани мозга начинаются уже с первых часов после ишемического воздействия лишь с той разницей, что при общей ишемии изменения происходят во всём бассейне выключенной артерии, а при фокальной – только в определённом локальном очаге. При этом ткань спинного мозга становится отёчной. Часть нейронов сморщивается, ядро этих клеток становится гиперхромным, ядрышки в нём не определяются. Для таких клеток характерна ацидофилия, т. е. окрашивание кислыми красителями.

Через 24 часа после фокальной ишемии ткань спинного мозга претерпевает значительные изменения. К этому сроку начинает формироваться ишемический очаг со всеми признаками некроза вещества спинного мозга, в котором рисунок спинного мозга стерт (серое и белое вещество почти неразличимы), а также определяется резкая отёчность и выраженный зернистый вид ткани мозга во всем очаге ишемического повреждения. Периваскулярные и перицеллюлярные пространства расширены. Большинство нервных клеток в очаге погибает, оставшиеся нейроны сморщены, ядра в них гиперхромны. Вокруг ишемического очага фокальной ишемии формируется переходная зона – пенумбра (особенно заметная на моделях фокальной ишемии). В этой зоне, наряду с погибшими (ацидофильными) клетками, присутствуют как нормальные, так и гиперхромные нейроны. Последние затем либо погибают, либо восстанавливаются. Расположение

ацидофильных и гиперхромных нейронов в пенумбре неравномерно. Наибольшее их количество расположено в проксимальном отделе пенумбры, примыкающем к очагу неполного некроза, и наименьшее – в дистальном ее отделе, граничащем с неизменённой тканью мозга.

В это время наблюдаются изменения и в астроцитах. Ядра многих астроцитов увеличены, отмечаются явления гиперхроматоза. Особенно хорошо видна реакция астроцитов на ишемическое воздействие при помощи гистохимических методик окрашивания. Очень активно реагируют астроциты, расположенные в проксимальном отделе пенумбры и, наоборот, активность астроцитов, расположенных в дистальном ее отделе, проявляется слабо.

При ишемическом повреждении спинного мозга астроциты вызывают активацию других типов не нервных клеток - макрофагов мозга. Одна из главных функций макрофагов - защитная. Они уничтожают проникающие через поврежденный ишемией гематоэнцефалический барьер микроорганизмы и активируют В- и Т-лимфоциты. Активированная микроглия способствует заживлению, фагоцитируя дегенерирующие клетки, секретируя интерлейкины-1 и -6, а также фактор некроза опухоли. Секретируемые микроглией вещества, в свою очередь, способствуют синтезу астроцитами фактора роста нервов и других нейротрофических факторов, участвующих в регенерации аксонов. Микроглия моделирует рост фибробластов и образование коллагена, что важно для формирования глиально-соединительнотканного рубца. Однако, наряду с положительными функциями, макрофаги усугубляют течение патологического процесса в ткани спинного мозга. Активированные макрофаги продуцируют нейротоксические факторы: возбуждающие аминокислоты – ВАК (глутамат, хинолиновую кислоту) и кислородные радикалы, повреждающие соседние клетки. Секретируемые активированной микроглией цитокины вызывают демиелинизацию аксонов, повреждают олигодендроциты, способствуют адгезии циркулирующих макрофагов и лейкоцитов на эндотелии.

Предположительно, особая роль в повреждении нейронов принадлежит избыточному образованию нейроглией оксида азота, который в физиологических

условиях является регулятором межклеточных взиамодействий в нервной и иммунной системах, но в избыточном количестве обладает нейротоксическими свойствами. Синтез оксида азота микроглией может происходить под влиянием липопротеинов очень низкой плотности [97], проникающих в ткань спинного мозга при нарушении гематоэнцефалического барьера.

В очаге некроза в этот период отмечен процесс нейронофагии, в котором активно участвуют макрофаги и вышеперечисленные глиальные элементы

Через 72 часа после ишемического воздействия в ткани спинного мозга происходит дальнейшее усиление дистрофических процессов. При этом в очаге некроза максимально выражены дегенеративные и ишемические изменения нейронов и глиальных элементов. Для этой стадии характерен цитолиз, при котором наблюдается побледнение тела и ядра клетки (хроматолиз). Процесс заканчивается превращением нервной клетки в клетку-тень. Формирование инфаркта спинного мозга, как правило, сопровождается развитием перифокального отека. Постепенно отек уменьшается, что способствует большей активности реактивных и репаративных процессов. Отек вещества спинного мозга в области инфаркта и окружающей его пенумбре подвергается редукции. В этот период на границе очага некроза и пенумбры начинается образование лейкоцитарного вала, состоящего преимущественно из сегментоядерных лейкоцитов. В самой пенумбре наблюдается увеличение числа гиперхромных нейронов.

Далее на месте некроза, вследствие гиперплазии глии, начинается образование глиально-соединительнотканного рубца. Пенумбра при этом полностью исчезает, гиперхромные нейроны либо восстанавливаются, либо погибают. На месте некроза остаётся только глиально-соединительнотканный рубец.

1.3.Патогенез травматического повреждения спинного мозга

Изучение механизмов ишемического повреждения спинного мозга показывает, что морфологические изменения в постишемическом периоде

наблюдаются не только в зоне непосредственного проявления действующего фактора, но и в удаленных от первичного очага отделах [70]. При этом локальные повреждения спинного мозга могут затронуть другие отделы не только спинного, но и головного мозга, периферической нервной системы.

Гибель клеток после ишемии может происходить в зависимости от конкретных условий двумя механизмами – некрозом или апоптозом [43].

1.3.1. Некротическое поражение нервной ткани при ишемии

Если интенсивность повреждающего фактора высока и механизмы апоптоза не могут быть реализованы, развивается некротическое повреждение клеток.

В зоне некротического очага постепенно формируется глиально-соединительнотканный рубец [27]. Полости, возникающие в пограничной с очагом области могут стать причиной развития кист.

1.3.1.1. Деструктивные механизмы, приводящие к гибели нейронов

По мнению ряда авторов, основой ишемического повреждения и гибели нейронов является так называемый глутаматный каскад [52; 122; 110].

Глутамат относится к основным возбуждающим нейромедиаторам и присутствует в большинстве нейронов головного мозга. Сигналы, поступающие от тела клетки по аксону к пресинаптическим окончаниям, вызывают их деполяризацию, сопровождающуюся входом Ca^{2+} и Na^{+} через потенциалзависимые ионные каналы пресинаптической мембраны и высвобождением глутамата. Глутамат активирует рецепторы постсинаптической мембраны и благодаря обратному захвату астроцитами быстро удаляется из внеклеточного пространства. Существуют две основные категории рецепторов возбуждающих аминокислот (ВАК) - быстро действующие ионотропные рецепторы, сопряженные с ионными каналами мембраны, и медленно действующие метаботропные рецепторы, сопряженные с G-белками. В свою очередь, ионотропные рецепторы, в зависимости от их чувствительности к аналогам глутамата, представлены несколькими подтипами. Это рецепторы

NMDA-типа, AMPA-типа и каинатные, избирательно взаимодействующие соответственно с N-метил-D-аспартатом (NMDA), альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионатом (AMPA) и каинатом [150].

Особого внимания заслуживают сопряженные с Ca^{2+}-каналами NMDA-рецепторы. Молекула этого рецептора имеет несколько функционально различных участков: участок связывания глутамата; регуляторный (соактивирующий) участок связывания глицина; потенциалзависимый участок связывания ионов Mg^{2+}; участок связывания фенциклидина внутри ионного канала; тормозной участок связывания двухвалентных катионов. Для активации NMDA-рецептора недостаточно только связывания глутамата – необходимо одновременное связывание глицина. Кроме того, при потенциале покоя, т.е. когда постсинаптическая мембрана не возбуждена, ионный канал NMDA-рецептора блокирован связанными с ним ионами Mg^{2+}. Для отсоединения ионов Mg^{2+} и, следовательно, для открывания ионного канала рецептора при его связывании с глутаматом и глицином требуется умеренная деполяризация мембраны (от -30 до -20 мВ).

Процесс ишемического повреждения и гибели нейронов делится на три фазы: индукции, усиления и экспрессии [88].

В первую фазу за счет резкого падения энергетического метаболизма и сопутствующих нарушений свойств клеточных мембран, вызываемых ишемией, начинается вход Ca^{2+} и Na^{+} в нейроны. При этом вход Ca^{2+} опосредуется потенциалзависимыми каналами N-типа. Развивающаяся деполяризция мебраны, что далее сопровождается высвобождением глутамата и аспартата из пресинаптических окончаний. Эти возбуждающие аминокислоты активируют рецепторы на телах постсинаптических нейронов. Активация рецепторов NMDA и открытие управляемых ими ионных каналов сопровождается входом ионов Ca^{2+} и Na^{+} в нейроны. Активация рецепторов AMPA- и каинатного типа также ведет к открыванию каналов для одновалентных катионов и входу в нейроны ионов Na^{+} и H^{+} . Вследствие нарушения осмотического баланса в ишемическом очаге происходит набухание нейронов, а истощение энергетических запасов не позволяет им выводить избыточный цитоплазматический Ca^{2+} . При высокой

концентрации Ca^{2+} активируются кальцийзависимые протео- и липолитические ферменты, которые играют ведущую роль в некрозе и лизисе нейронов.

Разрушение цитоплазматических органелл и дальнейшее истощение энергетических запасов также затрудняет выведение избыточного цитоплазматического Ca^{2+} , который аккумулируется в митохондриях. Перегрузка митоходрий ионами Ca^{2+} нарушает транспорт электронов по дыхательной цепи и ингибирует тем самым процесс окислительного фосфорилирования, обеспечивающего синтез АТФ, что вызывает нарушение деятельности энергозависимых систем, в частности ионных насосов мембран, что приводит к еще большему нарушению кальциевого гомеостаза. Вслед за "быстрыми" ионотропными рецепторами активируются "медленные" метаботропные рецепторы глутамата. Стимуляция G-белков активирует фосфоинозитид-специфичную фосфолипазу С, гидролизующую фосфатидилинозит-4,5-дифосфат с образованием вторичных посредников – инозит- 1,4,5-трифосфата (ИФ3) и 1,2-диацилглицерина (ДАГ).

Далее развивается вторая фаза эксцитотоксического процесса – фаза усиления. В этот период нарастание внутриклеточной концентрации Ca^{2+} становится экспоненциальным, что обусловлено синергической активацией нескольких механизмов, контролирующих внутриклеточные процессы. Дополнительный вход Ca^{2+} в клетку по мере нарастания деполяризации нейрона происходит в связи с тем, что активируются потенциалзависимые кальциевые каналы Т- и L-типов. Кроме того, вследствие избытка внутриклеточного Na^{+} электрогенный Na^{+}- Ca^{2+}-насос, обусловленный электрохимическим градиентом Na^{+}, начинает работать в обратном направлении. ИФ3 вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (митохондрий, эндоплазматического ретикулума). Высокая цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} в сочетании с образованием ДАГ активирует внутриклеточные ферментные системы, потенциалзависимые Ca^{2+} каналы и повышает чувствительность нейронов к стимулирующему действию ВАК. В присутствии избытка Ca^{2+} из нервных окончаний повреждённых клеток начинают высвобождаться синаптические запасы ВАК. В эксцитотоксический каскад

вовлекаются нейроны и глиальные клетки, расположенные на периферии ишемического очага, в них запускаются процессы, характерные для начальной фазы – фазы индукции. Таким образом, область ишемического повреждения расширяется.

Под влиянием высоких концентраций кальция продолжается активация протео- и липолитических ферментов, Это приводит к дальнейшему разрушению клеточных структур – органлл, макромолекул, что усиливает повреждающий эффект нейронов. Развивается третья фаза эксцитотоксического процесса – фаза экспрессии, в течение которой происходят необратимые изменения, приводящие к гибели нейронов.

Нейтральные протеазы (кальпаины) атакуют и разрушают нейрофиламенты, миелин и микротрубочки. Активация фосфолипазы ведёт к деградации фосфолипидов, повреждению клеточных мембран, содержащих липиды, и внутриклеточных органелл, высвобождению фосфатидов, неорганического фосфата и предшественников арахидоновой кислоты. Разрушение мембран приводит также к высвобождению лизосомных ферментов – протеаз и фосфатаз, усиливающих процесс аутодеструкции. Вазоактивные простагландины, тромбоксаны, являющиеся конечными продуктами метаболизма арахидоновой кислоты, и эндопероксидазы способствуют агрегации клеток крови и усиливают констрикцию прилежащих кровеносных сосудов, что дополнительно снижает кровоток. В результате развивается локальный тканевой ацидоз, вторичный по отношению к ишемии, и вновь, по принципу порочного круга, в котором ишемическое повреждение ведёт к дальнейшей ишемизации, инициируется глутаматный каскад. Кроме того, повреждение митохондрий и повышение метаболизма арахидоновой кислоты вызывает образование высокореактивных свободных радикалов, которые являются одним из основных факторов повреждения и гибели нейронов при ишемии [127; 122; 5; 6; 82].

1.3.1.2. Перекисное окисление липидов в ЦНС

Нейродеструктивной активностью обладают прежде всего

свободнорадикальные формы кислорода – перекись водорода (H_2O_2), супероксид-анионрадикал (O_2^-) и особенно, как показано в последнее время, эндогенная биологически активная молекула оксида (окиси) азота (NO), участвующая как межклеточный мессенджер в многочисленных физиологически значимых функциях не только нервной, но и иммунной, а также сердечно-сосудистой, систем [99; 29; 82; 83; 50].

При обычном функционировании нервной системы относительно низкие концентрации водорастворимых молекул NO, обладающих высокой степенью диффузии и способных свободно проходить через эндоплазматические мембраны, выполняют роль активного вазодилататора, расширяющего кровеносные сосуды, что улучшает трофику синаптических систем, способствуя регуляции активности NMDA-рецепторов, выделению нейромедиатора и передаче сигналов между нейронами [56].

Однако, в относительно высоких концентрациях оксид азота, являясь свободным радикалом, приобретает свойства важнейшего повреждающего фактора в цепи нейроповреждающего механизма и становится одним из основных агентов не только поражения, но и гибели нейронов при ишемии мозга [78; 60].

Все свободные радикалы являются инициаторами перекисного окисления липидов (ПОЛ) и в норме продуцируются в процессе функционирования ферментных систем субклеточных органелл (митохондрии, эндоплазматический ретикулум, пероксисомы) и цитозоля [16].

Обмен веществ в нормально функционирующих нейронах достаточно высок. Так потребление кислорода нейронами обычно составляет около 3,5 мл/100 г в мин. Если этот показатель падает ниже 1,5 мл/100 г в мин., то, как правило, возникают необратимые изменения клеток нервной ткани. Нарушение кровоснабжения мозга при его ишемическом повреждении индуцирует накопление свободнорадикальных форм кислорода и формирование избыточных молекул оксида азота, которые, являясь высоко реактивными, вызывают окисление биомакромолекул, нарушают метаболизм нейронов, активируют процесс повреждения мембран нейронов [66; 14; 84]. В основе механизма, по

которому при ишемическом повреждении спинного мозга расстраивается регуляция ПОЛ, лежат, по-видимому, нарушения в электронно-транспортной цепи митохондрий, точнее нарушения процесса окислительного фосфорилирования, что ведет к усилению активации ПОЛ вследствие уменьшения в клетке уровня макроэргов, в частности аденозинтрифосфата (АТР), сопровождаемого соответствующим возрастанием аденозинмонофосфата (АМР) [36]. Образование из АМР аденозина, инозина, гипоксантина приводит к повышению внутриклеточного гипоксантина. В норме ксантиндегидрогеназа расщепляет гипоксантин до ксантина и мочевины, но при ишемии может происходить Ca^{2+}-зависимый протеолиз ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. Ксантиноксидаза с помощью молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов, способна катализировать образование O_2^-, H_2O_2 и NO - радикалов. В итоге происходит накопление в клетке инициаторов свободнорадикального ПОЛ в количествах, превышающих протекторные возможности клеточных антиоксидантных систем.

1.3.2. Апоптоз как возможный тип гибели нейронов при ишемии

В последнее время большое внимание уделяется апоптозу – процессу программируемой гибели нейронов, являющемуся одним из важнейших механизмов регулирования количества и качества клеточных популяций и одним из основных факторов эмбрионального гистогенеза мозга [76; 114; 17; 43]. В эмбриогенезе апоптоз реализуется в результате дерепрессии проапоптозных генов, активации эндонуклеаз и комплекса цистеиновых протеаз (каспаз), что приводит к фрагментации и конденсации ДНК, протеолизу, повреждению структур цитоскелета и последующему распаду клеточного тела с образованием так называемых апоптозных тел, окруженных неповрежденной цитоплазматической мембраной и содержащих неповрежденные клеточные органеллы и фрагменты ДНК. Апоптозные тела фагоцитируются макрофагами.

Несомненно, что при ишемическом инфаркте и травме спинного мозга основным типом гибели нейронов является некроз, наряду с этим может участвовать и апоптоз,

причем оба процесса развиваются параллельно, хотя не исключается возможность гибели нейронов вследствие острого осмотического (цитотоксического) отека и аутофагоцитоза. Факторы, определяющие гибель нейронов по тому или иному типу, изучены еще недостаточно. Показано, что апоптоз выявляется в спинном мозге после воздействия каината, общей ишемии, фокальной ишемии и травмы спинного мозга. Механизмы гибели нейронов, включающие оксидативный стресс, гиперактивацию глутаматных рецепторов, нарушение ионного гомеостаза, при определённых условиях могут сопровождаться экспрессией генов, ответственных за синтез белков, опосредующих процесс апоптоза и последующую гибель клетки [82].

Так, при фотоиндуцированном тромбозе спинного мозга крыс гиперстимуляция глутаматных рецепторов и возникающие при этом патобиохимические каскады могут приводить к активации эндонуклеаз и повреждению ДНК, характерному для апоптоза [79; 90; 49; 59; 114].

1.3.3. Вторичные патологические изменения

Локально возникающие в ЦНС поражения нейронов при ишемии вызывают каскад вторичных повреждений в удаленных от очага первичной патологии, но прямо или опосредованно связанных нейрональными взаимодействиями зонах [121; 70], что проявляется в спонтанных кровоизлияниях в различных органах и отдельных участках кожи, воспалительных реакциях, нарушением трофики и развитием ишемии интактных тканей, вызывающим новую волну характерных биохимических сдвигов. Дополнительное повышение ионов Ca^{+2}, кининов, возбуждающих аминокислот, серотонина вызывает вторичную реакцию на интактные нейроны, приводящую к развитию дегенерационных процессов, разрушению миелиновой оболочки и гибели.

Развивающаяся денервация различных тканей приводит к повышению их чувствительности к нейромедиаторам – ацетилхолину, адреналину и т.д., что приводит к снижению уровней в этих тканях гликогена, АТФ, креатинфосфата, нарушению обменных процессов в мышцах, снижающему их сократимость и растяжимость. Увеличивается вероятность развития пролежней, суставно-

мышечных контрактур, трофических язв, деформаций костной ткани. Повышается риск возникновения патологии выделительной системы – камнеобразования, воспалительных процессов, почечной недостаточности.

1.4. Основные этапы восстановления нарушенных функций спинного мозга

Основными этапами функционального восстановления постишемического повреждения структур спинного мозга по данным патологической физиологии и патологической анатомии являются регенерация и компенсация. Некоторые авторы выделяют еще реституцию, но реституция – это, по сути, часть регенерации.

1.4.1. Регенеративные пути постишемического восстановления

Регенерация – способность структурно-функционального восстановления тканей после их повреждения или частичной утраты.

Регенерация включает совокупность процессов, направленных на восстановление функций обратимо поврежденных структур – устранение декомпрессии структур мозга, восстановление кровообращения, нейродинамических взаимоотношений.

Восстановление нервной ткани после ишемии зависит от степени повреждения. После спадения отека восстанавливается нормальное кровообращение, что способствует восстановлению функции нервной ткани, при условии отсутствия необратимых повреждений нейронов. Длительное действие факторов повреждения повышает вероятность развития необратимых изменений в структурах нервной системы. Поэтому важным является устранение длительно действующих повреждающих факторов – осколков, кист, рубцов.

Быстро сделанные операции по стабилизации позвоночника, устранению субдурального отека, восстановлению тока цереброспинальной жидкости в зоне повреждения способны восстановить постишемические нарушения [148].

Интенсивные физические нагрузки также способствуют эффективному восстановлению даже после продолжительного паралича. Это обусловлено с

одной стороны усилением обменных процессов в мышцах, с другой – восстановлением афферентных и эфферентных связей [107].

Важными факторами регенерационных процессов после ишемии являются восстановление проницаемости клеточных мембран, окислительно-восстановительных процессов в клетках, активация ферментных систем, поэтому особое значение приобретает медикаментозная терапия, наиболее эффективная в первые часы и дни после ишемического повреждения [115]. В исследованиях, направленных на поиск способов фармакологической коррекции ишемических повреждений спинного мозга, используются антиоксиданты [54; 61; 129], блокаторы кальциевых каналов [120; 73; 116], блокаторы глутаматных и аденозиновых рецепторов [112], локальная гипотермия [101; 126], а также метод формирования ишемической толерантности спинного мозга после предварительной умеренной гипоксии [77; 133; 106].

Способность нервной ткани человека к восстановлению после ишемического повреждения связана с регенерацией периферических нервных волокон, в телах нейронов возможна лишь внутриклеточная регенерация.

Спраутинг – процесс восстановления синаптических связей растущих аксонов с мотонейронами повреждённого участка спинного мозга происходит на основе конкуренции за обладание синаптическими участками. Пока продолжается рост нервных волокон к соответствующему синаптическому участку, он может оказаться занятым эфферентными системами более низкого филогенетического уровня. Кроме того, длительная депривация приводит к развитию необратимой дегенерации и гибели спинальных нейронов. Однако, восстановление сенсомоторной функции возможно даже через несколько лет после травмы [94].

1.4.2. Компенсаторные механизмы восстановительных процессов

Компенсация включает совокупность реакций, обеспечивающих функциональное замещение утраченных или недостаточных функций. Компенсация обычно является завершающим этапом восстановительных процессов.

Компенсаторные реакции связаны в основном с вовлечением в восстановительные процессы не задействованных ранее аксонов. При незначительных или умеренных повреждениях компенсаторные реакции дополняют регенерационные процессы, обеспечивая практически полное восстановление сенсомоторных функций. Потенциально возможно частичное восстановление функций даже после почти полной перерезки спинного мозга, когда число сохранившихся аксонов не превышает 10% [142].

Имеются данные о возможности частичного восстановления двигательной функции спинного мозга человека после травматического повреждения около 90% его поперечного сечения [27].

Следует отметить, что при значительных повреждениях спинного мозга регенерационные процессы практически полностью замещаются компенсаторными, которые не могут обеспечить полноценное функциональное восстановление.

1.5. Методы коррекции ишемического повреждения спинного мозга

1.5.1. Нефармакологические методы

1.5.1.1. Гипотермия

Перспективным способом уменьшения вторичных повреждений мозга после ишемического воздействия является поддержание тканей в состоянии сниженного метаболизма, приводящего к ингибированию нейрохимических реакций. Этого можно достичь снижением температуры спинного мозга. Гипотермия не является новым методом, спорадически она применяется уже в течение 50-ти лет [15]. Недавние экспериментальные наблюдения показали, что гипотермия подавляет высвобождение ВАК и образование свободных радикалов и, таким образом, ослабляет каскад вторичных патогенных реакций при повреждении мозга [128]. При экспериментальном моделировании ишемии гипотермия способствует восстановлению неврологических функций и снижает процент повреждения нейронов в постишемическом периоде [53; 89; 58].

1.5.1.2. Хирургическая коррекция и трансплантация

Повышение восстановительной способности аксонов может быть достигнуто за счет создания благоприятных условий или путем замещения разрушенных структур новыми клетками [9]. Обновленное микроокружение стимулирует рост аксона, но может и полностью замещать поврежденные нейроны.

В процессе регенерации поврежденного аксона важной составляющей является восстановление его миелиновой оболочки. В опытах на мышах было показано стимулирующее действие миелинассоциированных гликопротеинов как на регенерацию аксонов, так и восстановление их миелиновых оболочек [68]. Пересадка в поврежденный участок спинного мозга обонятельной оболочечной глии, постоянно сохраняющей способность к миелинизации, стимулировала восстановительные процессы у экспериментальных животных [135; 86; 87; 84].

В хирургии для восстановления функции мочевого пузыря применяется метод создания перемычек из периферических нервов, путём их реиннервации из сегментов спинного мозга, расположенных выше уровня поражения [18].

В литературе имеются данные о клиническом применении методов защиты спинного мозга от ишемических повреждений при торакоабдоминальных операциях на аорте [130].

Выделяемый нейронами, астроцитами, леммоцитами, фибробластами, тромбоцитами белковый фактор роста – мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor – BDNF), который в норме всегда присутствует в крови, не только повышает жизнеспособность нейронов в условиях депривации, но и стимулирует регенерацию поврежденных аксонов. Введение этого фактора или аутогенная трансплантация фибробластов в зону повреждения может значительно повысить эффективность регенерационных процессов [38]. При повреждении нервных клеток в кровь поступает, синтезируемый в нейронах, цилиарный нейротрофический фактор (ciliary neurotrophic factor – CNTF), который, как известно, является одним из ведущих факторов дифференцировки клеток нервной ткани, а также способствует выживанию и восстановлению

нейронов [35]. Имеются сведения, что введение в брюшную часть аорты крыс стволовых клеток костного мозга вызывает усиление выработки CNTF, что стимулирует регенеративные процессы и ускоряет восстановление моторных функций после вызванной ишемии спинного мозга [119].

1.5.2. Фармакологические нейропротекторы

Применение экспериментальных моделей ишемии позволяет изучать не только патоморфологические изменения в различных отделах спинного мозга, но и необходимо при оценке эффективности нейропротекторных свойств фармакологических препаратов на разных этапах ишемического повреждения.

При исследовании тех или иных фармакологических нейропротекторов предпочтительным является применение моделей, воспроизводящих фокальную ишемию. Так, например, эффективность блокаторов NMDA-рецепторов была при использовании моделей общей ишемии более низкой, чем при моделировании фокального ишемического очага. Это связано с тем, что при значительном падении кровоснабжения спинного мозга интенсивнее развивается тканевой ацидоз, влияющий на снижение активности, опосредуемой NMDA-рецепторами.

Фармакологические подходы к экспериментальной коррекции ишемического повреждения определяются исходя из механизмов повреждения нейронов. Как было отмечено, к таким механизмам можно отнести нарушения ионного гомеостаза нейронов вследствие изменения проницаемости клеточных мембран, запуска глутаматного каскада, повреждения мембран за счет образования свободных радикалов [127; 96; 93]. Препараты, способные если не устранить, то хотя бы снизить действие основных повреждающих факторов, могут рассматриваться как перспективные средства, стимулирующие регенеративные процессы при ишемическом повреждении спинного мозга и способствовать ускорению его функционального восстановления.

1.5.2.1. Средства, действующие на рецепторы возбуждающих аминокислот

В последние годы сформировалось представление о том, что главные компоненты нейрохимического ответа на ишемическое повреждение мозга – это высвобождение и избыточное накопление глутамата и аспартата с последующим развитием гиперфункции соответствующей медиаторной системы и цитотоксическим повреждением нейронов. В экспериментальных исследованиях, проведённых на моделях как общей, так и фокальной ишемии показано, что повышение концентрации глутамата в плазме крови в течение 24 ч после ишемического повреждения приводит к быстрому прогрессированию деструктивных процессов в нервной ткани [55; 146; 47]. В настоящее время вещества, блокирующие рецепторы ВАК, представляют собой один из наиболее привлекательных для исследователей класс препаратов, способных блокировать повреждающий эффект и тем самым способствовать стимулированию регенеративных процессов при ишемических повреждениях головного и спинного мозга в эксперименте [96; 88; 92]. Для блокады NMDA-рецепторов используются их конкурентные антагонисты: D-2-амино-5-фосфовалериановая кислота (APV) и 3-(2-карбоксипиперазин-4-ил)-пропил-1-фосфоновая кислота (CPP). Они нормализуют метаболизм и улучшают восстановление неврологических функций, но плохо проходят через гематоэнцефалический барьер. В качестве неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов используются соединения, которые связываются с участком открытого ионофора рецептора и, таким образом, предупреждают вход ионов в нейрон. К таким соединениям относятся фенциклидин, кетамин, декстрометорфан. Внутривенное введение фенциклидина (1-4 мг/кг) до экспериментального ишемического повреждения ослабляет неврологический двигательный дефицит, возникающий в постишемический период [69]. Декстрометорфан (10мг/кг) при введении после ишемического воздействия улучшает восстановление двигательных функций и снижает региональный отёк. Производное декстрометорфана, декстрорфан (10 мг/кг), также нормализует неврологический статус, поддерживает внутриклеточную концентрацию Mg^{2+} и

снижает высвобождение глутамата [109]. Кетамин улучшает восстановление моторных функций в постишемическом периоде и поддерживает катионный гомеостаз [123]. Следует отметить, что вопрос о терапевтическом применении неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов пока не решен, т.к. есть данные об определённой нейротоксичности этих препаратов. Кетамин и фенциклидин, возможно, индуцируют патологические изменения в нейронах, например, при их применении отмечена вакуолизация клеток зубчатой извилины. Кроме того, они вызывают экспрессию белков стресса и белков теплового шока [105].

В физиологических условиях эндогенным модулятором NMDA-рецепторов служат ионы магния; изменения гомеостаза магния ведут к нарушению синаптической передачи. Состояние гипомагниемии, наблюдаемое после экспериментального ишемического повреждения мозга, корригируется введением солей магния (MgCb, $MgS0_4$), которые восстанавливают потенциалзависимую блокаду NMDA-рецепторов. В некоторых экспериментальных исследованиях Mg^{2+} улучшал восстановление когнитивных функций, ослаблял двигательные расстройства и образование регионального отёка мозга [95]. При коррекции экспериментального ишемического повреждения мозга используется также модуляция глициновых участков NMDA-рецепторов [123; 71].

Высокую эффективность показали индол-2-карбоновая кислота и кинуренат, блокирующие глициновые участки NMDA-рецепторов и AMPA-каинатные рецепторы. Индол-2-карбоновая кислота (20 и 50 мг/кг внутривенно) и кинуренат (300 мг/кг внутривенно) улучшают восстановление двигательных и когнитивных функций, уменьшают региональный отёк мозга, поддерживают общий катионный гомеостаз. Кроме того, кинуренат ослабляет степень увеличения общей концентрации кальция в тканях, а индол-2-карбоновая кислота значительно уменьшает постишемические содержания ионов Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+} и Zn^{2+}.

Так как наблюдаемое после вызванного ишемического повреждения высвобождение ВАК, приводит к вторичным повреждениям или гибели нейронов, соединения, модулирующие ВАК-эргическую нейропередачу, могут быть эффективными нейропротекторами [122; 93; 6].

1.5.2.2. Блокаторы кальциевых каналов

Роль длительного увеличения концентрации внутриклеточного свободного кальция в патогенезе вторичных повреждений после ишемического повреждения мозга общепризнана, поэтому большое количество экспериментальных исследований направлено на изучение нейропротекторных возможностей блокаторов кальциевых каналов.

В экспериментах на крысах обнаружено повышение концентрации кальция в поврежденных компрессией и ишемией областях мозга. В этих условиях опыта (S)-эмопамил, фенилалкиламиновый блокатор кальциевых каналов и серотониновых рецепторов, уменьшал нарушения мозгового регионального кровотока, улучшал восстановление двигательной активности, ослаблял нарушения моторных функций [103; 104].

Дигидропиридиновый блокатор кальциевых каналов – нимодипин, при экспериментальном моделировании ишемического повреждения вызывал расширение артерий мягкой мозговой оболочки, способствовал разрастанию сосудов в коре мозга [149; 93]. Однако эффекты антагонистов кальция неоднозначны, а их терапевтическое влияние может зависеть от индивидуальных свойств различных препаратов этого класса.

1.5.2.3. Антиоксиданты

Изучение влияния антиоксидантов является важным направлением в исследовании фармакологических нейропротекторов. Размер и степень повреждения, вызываемого свободными радикалами, зависит от соотношения между уровнем эндогенных антиоксидантов и концентрацией токсических радикалов [48]. Экзогенные антиоксиданты, предупреждают ионные повреждения также как эндогенные. Они снижают образование свободных радикалов, улавливают их, повышают активность систем эндогенных антиоксидантов, снижают активность нейтрофилов.

После ишемического повреждения ткани мозга, образование свободных радикалов может вызывать вторичные нарушения клеточных мембран нейронов и

кровеносных сосудов. Полиненасыщенные жирные кислоты, не включённые в липиды, формирующие клеточные мембраны, наиболее подвержены атакам свободных радикалов, инициирующих ПОЛ, которое ускоряется в присутствии свободного железа. Существуют эндогенные защитные механизмы, использующие антиоксиданты или ловушки свободных радикалов: супероксиддисмутаза (СОД) превращает высокоактивные свободные радикалы в токоферолы (альфа-токоферол и бета-каротин), образующие защитное покрытие на клеточных мембранах и могут быть источниками гидроксильных групп для нейтрализации свободных радикалов [132], аскорбиновая кислота (витамин С) и ретиноевая кислота (витамин А) могут действовать в комплексе с токоферолами [45; 96; 93].

1.5.2.4. Ингибиторы образования свободных радикалов

Ингибиторы ксантиноксидазы могут снижать образование O^{2-}. Аллопуринол и его метаболит – оксипуринол, фолиевая кислота и птеринальдегид (продукт распада фолиевой кислоты) конкурентно угнетают активность ксантиноксидазы. С другой стороны, может происходить угнетение протеолитических ферментов, т.к. именно протеолиз вызывает необратимое превращение ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. В экспериментах на мышах с генетически сниженным уровнем nitric oxide synthase (NOS) показано уменьшение на 40% объема ишемического очага как на модели окклюзии средней мозговой артерии [72], так и при общей ишемии мозга [108]. Хелатирование железа тоже может уменьшать образование свободных радикалов. Хелатор железа - дефероксамин снижает образование OH^{-} в реакциях с участием Fe^{3+} - реакция Haber-Weiss и Fenton [109].

1.5.2.5. Ферментная инактивация свободных радикалов

Как уже указывалось, в ткани мозга имеются ферменты, выполняющие функцию улавливания свободных радикалов (СОД, каталаза), основная роль которых состоит в нейтрализации токсического действия O^{2-} и H_2O_2. Эффективность фармакологических препаратов, созданных на основе этих ферментов, показана на экспериментальных моделях. Так, СОД в составе липосом оказывала

нейропротекторное действие, уменьшая вазогенный отёк и размер инфаркта после фокальной ишемии мозга [74]. На модели фокальной ишемии показано улучшение постишемического неврологического восстановления при применении препарата полиэтиленгликоль-СОД и липосом супероксиддисмутазы, причём полиэтиленгликоль-СОД один или в сочетании с полиэтиленгликоль-каталазой при введении перед транзиторной фокальной ишемией головного мозга значительно уменьшал зону инфаркта [117].

1.5.2.6. Неферментные ловушки свободных радикалов

Некоторые соединения напрямую взаимодействуют со свободными радикалами, превращая их в менее реакционноспособные вещества и, таким образом, снижают уровень ПОЛ. К ним относятся: альфа-токоферол, аскорбиновая кислота, кортикостероиды, 21 -аминостероиды.

Показано, что эффективность альфа-токоферола (витамина Е) в предотвращении ПОЛ зависит от концентрации на мембране клеток в момент ишемического повреждения. Витамин Е подавляет ПОЛ, ускоряет восстановление электрофизиологических показателей и способствует восстановлению неврологических функций в постишемическом периоде, что показано на моделях не только общей, но и фокальной ишемии [125]. Однако, альфа-токоферол эффективен только при профилактическом применении (до ишемического повреждения), т.е. в момент ишемического воздействия на мембранах нейронов уже должна быть достаточно высокая концентрация витамина Е, способная ограничить процесс ПОЛ [143].

Нейропротекторный эффект кортикостероидов основан на повышении их концентрации в ткани мозга, но применение высоких доз этих гормонов клинически невозможно из-за побочных эффектов, присущих всем кортикостероидам.

Довольно выраженной антиоксидантной активностью, направленной на угнетение ПОЛ, обладают 21-аминостероиды (лазароиды). Замещение 21-й гидроксильной группы на аминогруппу в неглюкокортикоидной части стероидной молекулы приводит к значительному увеличению антилипопероксидантной

активности (ингибирование ПОЛ) в сравнении с метилпреднизолоном, при этом значительно уменьшается объем ишемического повреждения при окклюзии средней мозговой артерии у крыс [44]. Препараты этой группы являются активными ловушками свободных радикалов, сходными по механизму действия с альфа-токоферолом (витамин Е). Они обладают действием сберегающим витамин Е и стабилизирующим мембраны [6].

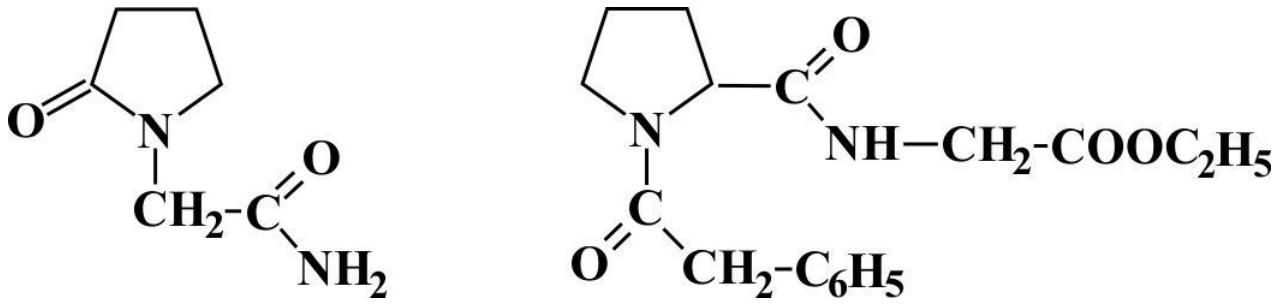
1.5.2.7. Ганглиозиды

Кислые гликолипиды – ганглиозиды, содержщие сиаловую кислоту, обладают выраженными нейропротекторными свойствами [139]. Их высокие концентрации в нервной ткани обусловливают обогащение поверхности возбудимых мембран, а также способствуют нормальному развитию и дифференцировке нейронов. Введенные в организм ганглиозиды, могут защитить тела нейронов от постишемического повреждения благодаря способности встраиваться в мембраны нейронов и обеспечивать сохранение ионного внутриклеточного гомеостаза. Например, ганглиозид GM1, встраиваясь в мембрану нейронов способен подавить ПОЛ, действие фосфолипазы, глутамата, снижая таким образом поступление в клетки избытка ионов кальция [63; 1]. При этом ганглиозид GM1 не обладает нейроповреждающим действием и может достаточно продолжительное время сохраняться в активной форме в кровяном русле.

В настоящее время опытами на молекулярном уровне выявлено ингибирование NO-синтазы с помощью ганглиозида GM1 [57]. Данный ганглиозид, также, уменьшает церебральный отек, восстанавливает ионное равновесие в постишемическом периоде [118], устраняет дисбаланс в активности дофамин- и серотонинергических нейронов [85], способствует восстановлению свойств дофаминэргических нейронов после нарушения нигростриатной системы [98].

1.5.2.8. Нейрометаболические стимуляторы (ноотропы)

В последнее время большой исследовательский интерес вызывают ноотропы [30; 13]. Пирацетам – непептидный специфический стимулятор памяти – блокирует потенциалзависимые калиевые и кальциевые каналы, препятствуя развитию осмотического внутриклеточного дисбаланса, нормализует моторные функции мозга в постишемическом периоде [137; 65; 131]. Однако активность этого препарата как стимулятора регенеративных процессов невысока. Значительно более эффективным нейрометаболическим стимулятором оказался дипептидный аналог пирацетама на основе пролина. На локальных экспериментальных моделях ишемии наиболее высокий нейропротекторный эффект наблюдался при использовании дипептидного ноотропа ГВС-111 (Рис. 2) или ноопепта (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролил-глицина, United States Patent, number 5 439 930).



ПИРАЦЕТАМ (200 – 800 мг/кг)

ГВС-111 (0,1 – 1,2 мг/кг)

Рис. 2. Пирацетам и его пептидный аналог – ГВС-111 (ноопепт).

ГВС-111 проявил выраженное защитное действие при амнезии, вызванной электрошоком, травмой головного мозга [113; 67]. ГВС-111 продемонстрировал способность ослаблять выраженность когнитивных нарушений, вызванных пренатальным воздействием алкоголя [37], а также локальной ишемией фронтальной коры [31].

В экспериментах, выполненных in vitro на клеточных моделях, показано защитное действие ГВС-111 посредством понижения токсичности эндогенного

глутамата и как следствие – снижение количества погибших нейронов при 2-3 часовой кислородно-глюкозной депривации [2; 3].

Обладая аналогичными с пирацетамом фармакологическими свойствами, ГВС-111 по уровню эффективных концентраций превосходит его приблизительно на 4 порядка [51; 67; 13; 23].

Ноопепт обычно используется в качестве нейропротектора для предупреждения развития патологических процессов в ЦНС, но учитывая его свойства, этот препарат может рассматриваться и как стимулятор процессов регенерации в постишемическом периоде.

Обзор литературы показывает, что изучение возможности морфофункционального восстановления пораженных вследствие ишемии нервных структур спинного мозга является одной из актуальных проблем медицины. Среди методов, позволяющих моделировать ишемию спинного мозга исследовательский интерес представляет метод фокального фотоиндуцированного тромбоза как наименее инвазивный и воспроизводимый. Для исследования нарушений, возникающих вследствие ишемии кроме современных морфологических методов необходимо использовать методы оценки поведения экспериментальных животных, позволяющие выявить взаимосвязь между морфологическими и функциональными изменениями. В качестве стимулятора нейрорегенерационных процессов после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга представляется перспективным использование ноопепта ГВС 111, показавшего высокий стимулирующий эффект при экспериментальной ишемии различных отделов головного мозга.

.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 далее по тексту обозначается как «норма».

Группы 2 – 4 – оперированный контроль – животные, которым была сделана операция и проведена световая обработка, но без введения бенгальского розового. Эти группы далее 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 последействия.

Группы 5 – 7 – опытные группы, на которых моделировалась ишемия грудного отдела спинного мозга. Эти группы далее обозначаются как «опыт 1». «Опыт» 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 последействия.

Группы 8 – 10 – опытные группы, на которых моделировалась ишемия грудного отдела спинного мозга и проводилась нейропротекторная терапия. Эти группы обозначаются далее 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

последействия.

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.

2.1. Моделирование фотоиндуцированного тромбоза

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 [22].

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 [24; 26] (Рис. 3).

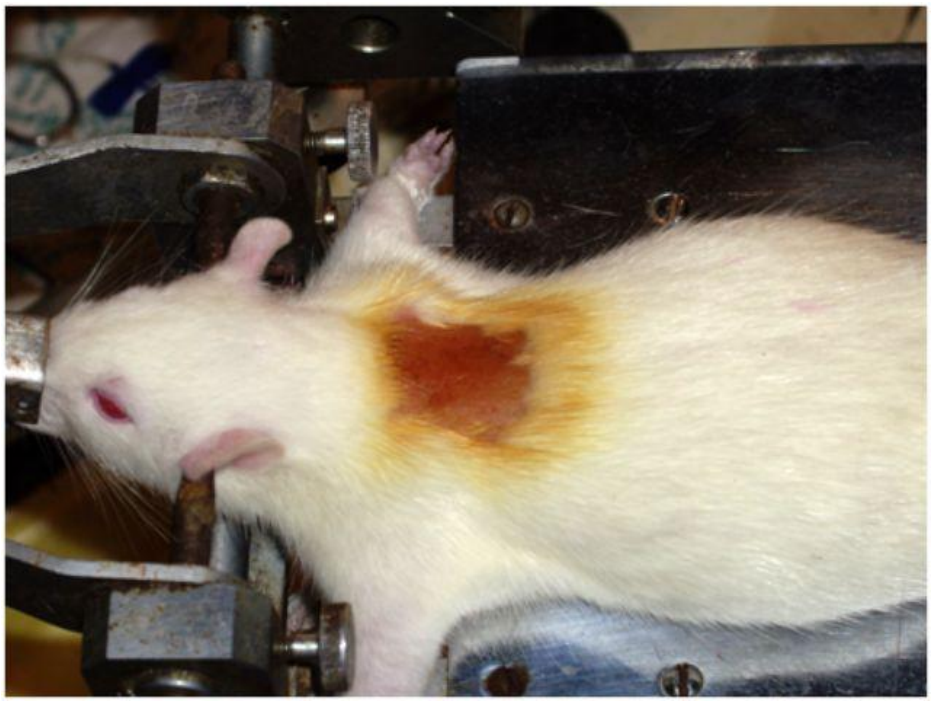


Рис. 3. Установка для моделирования фототромбоза спинного мозга крысы (перед операцией).

Ножницами производили срединный продольный разрез кожи, раздвигали ее и отсепаровывали позвоночник (Рис. 4).

Рис. 4. Установка для моделирования фототромбоза спинного мозга крысы (операция).

Световоды фиксировали на расстоянии 1-2 мм от поверхности грудного отдела позвоночника. Продолжительность световой экспозиции составляла 30 минут. В период экспозиции поверхность позвоночника постоянно обрабатывалась физиологическим раствором с целью охлаждения и предотвращения термокоагуляционного эффекта (рис. 5). Контрольные измерения с помощью микротермистера показали, что температура в области светового пучка не превышала 37,0°C [24; 26].

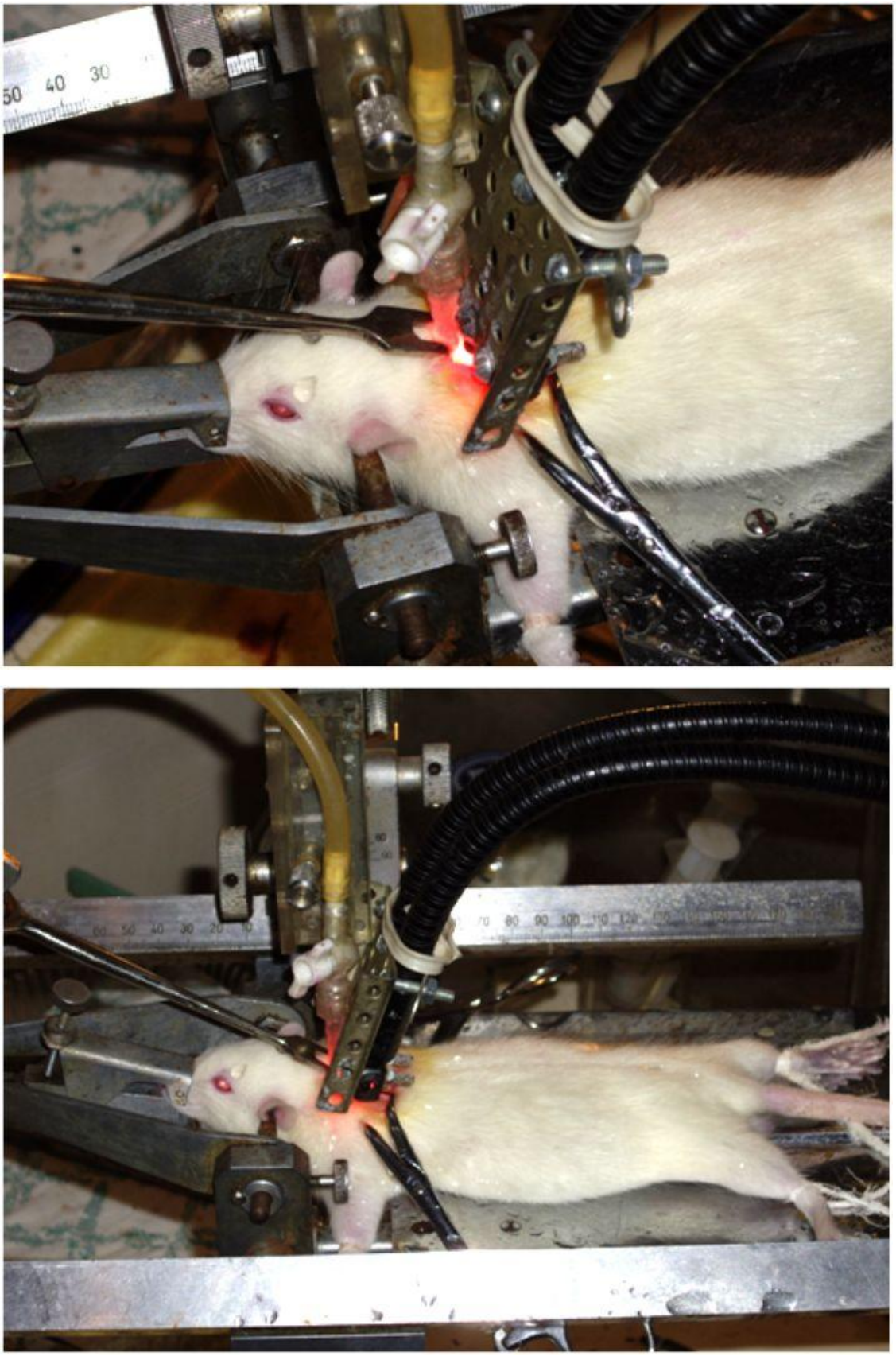


Рис. 5. Установка для моделирования фототромбоза спинного мозга крысы (световая экспозиция).

После экспозиции рану обрабатывали сухой калийной солью пенициллина, кожу ушивали, шов обрабатывали 2% раствором йода (Рис. 6).

Контрольной группе животных введение красителя в кровь не проводилось, но остальные этапы операции были воспроизведены в полном объеме.

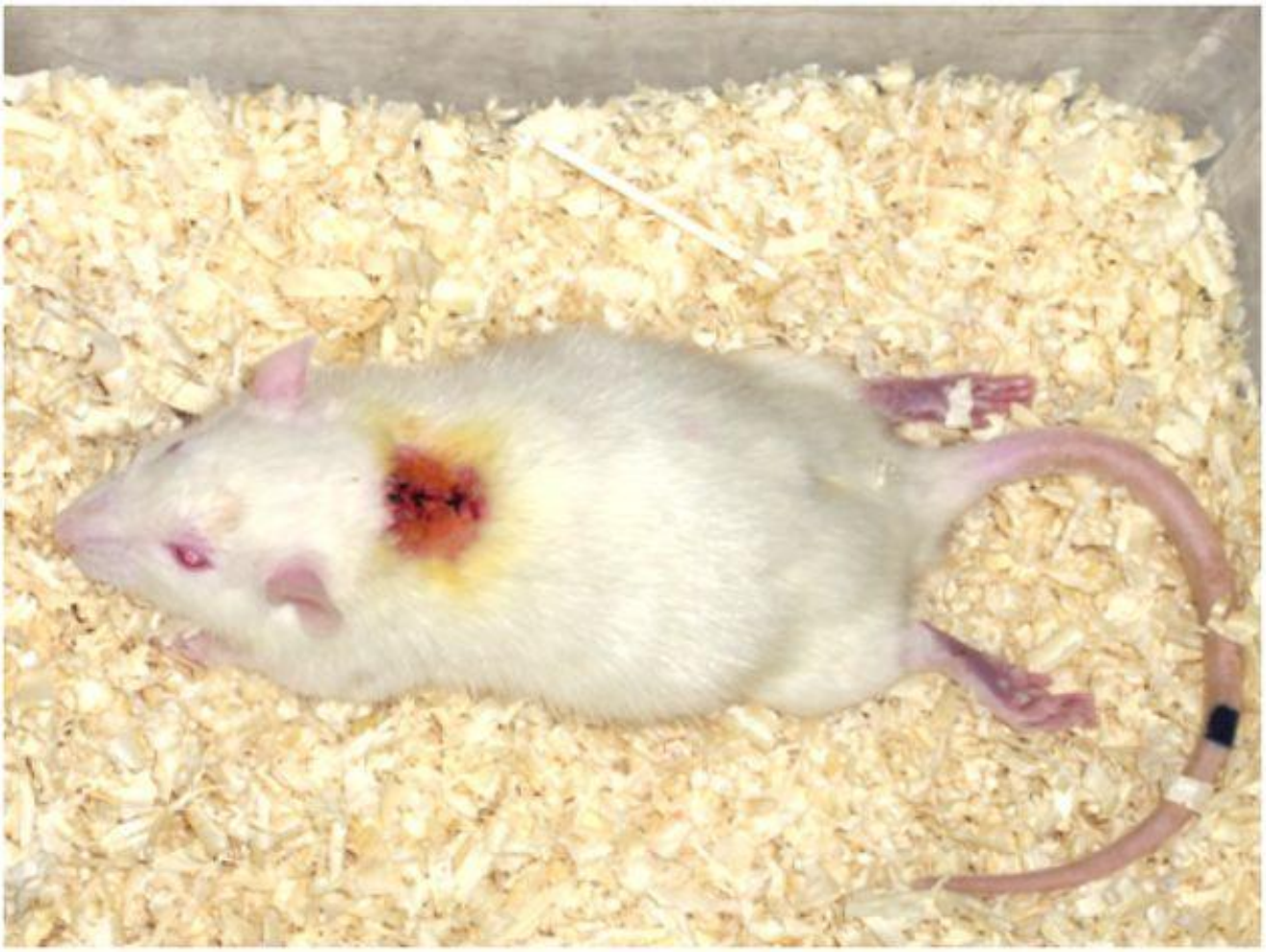


Рис. 6. Крыса после операции.

2.2. Методы исследования мозга животных после фокальной ишемии.

2.2.1. Нейроморфологическое исследование.

Для проведения морфологических исследований наркотизированных крыс транскардиально перфузировали модифицированным фиксатором Теллесницкого [19] смесью формалин-спирт-уксусная кислота ФУС в пропорции 2:7:1. Спинной мозг извлекали через 4-5 ч, постфиксировали – 1 ч. Затем спинной мозг обезвоживался 90% изопропанолом – 1 ч, изопропанолом-99 1 ч, изопропанолом-99 1,5 ч, изопропанолом-99 2 ч, [11]. После проводки по изопропанолам спинной

мозг переносили в расплавленный парафин (56-60ºС) на 4-5ч или на ночь, далее спинной мозг помещали на 30 мин в свежий парафин, для окончательной заливки и формирования парафинового блока. Парафиновые блоки нарезали на парафиновые срезы 6-8 мкм толщиной и монтировали на стекла, обработанные яичным альбумином-глицерином. Парафиновые срезы депарафинизировали в ксилоле 2 х 2-3 мин, промывали в абс. этаноле 1 мин, в 96% этаноле 1 мин, в 70% этаноле 1 мин, в 50% этаноле 1 мин, в двух сменах дистиллята. Депарафинированные срезы окрашивали:

1. Гематоксилином и эозином по Маллори [19].

2. Крезиловым фиолетовым прочным по методу Ниссля.

Окрашивали крезиловым фиолетовым прочным (100 мг крезилового фиолетового, 100 мл ацетатного буфера pH 3.4 (130 мг ацетата натрия, 1.2 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл дистиллята), отфильтрованного перед использованием) в течение 2-3 мин, промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70%, 96%, абс. х 2), осветляли в ксилоле (х 2) и монтировали под покровное стекло в Канадском бальзаме [7; 10].

3. Люксолевым прочным синим с докрашиванием крезиловым фиолетовым прочным, метод комбинированного окрашивания миелиновых волокон и клеток мозга.

Окрашивали 1—2 ч при 56—60°С в 0,01% спиртовом растворе люксолевого синего прочного (запасной раствор: люксолевый синий прочный 1г, уксусная кислота ледяная 5мл, спирт 96° до 100мл, для приготовления рабочего (0,01%) раствора 1мл запасного раствора красителя смешивают со 100 мл 96° спирта. Рабочий раствор красителя можно использовать повторно), промывали срезы последовательно в 96° и 70° спиртах и дистиллированной воде, дифференцировали в 0,1 % растворе буры (процесс дифференцировки окрашивания миелина необходимо контролировать под микроскопом — краситель постепенно удаляется из среза, а миелиновые волокна сохраняют яркую сине-зеленую окраску), споласкивали в 5% растворе уксусной кислоты,

окрашивали в течение 2—5 мин крезиловым фиолетовым прочным (крезиловый фиолетовый прочный 250—50мг, натрий уксуснокислый 130мг, уксусная кислота ледяная 1,2мл, вода дистиллированная 100мл), промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70%, 96%, абс. х 2), осветляли в ксилоле (х 2) и монтировали под покровное стекло в Канадском бальзаме [8].

4. Гематоксилином ванадиевым кислым фуксином, позволяющим выявлять как нормальные, так и ишемически поврежденные нейроны, а также дифференцировать степень ишемического повреждения нейронов.

Окрашивали гематоксилином 5 мин, промывали в дистиллированной воде, осветляли в кислом спирте (1% HCl в 70- или 96% этаноле) – несколько секунд, чернили в проточной водопроводной (не дистиллированной!) воде или в 1% бикарбонате - 5 мин, промывали в дистиллированной воде, окрашивали кислым ванадиевым фуксином (75мл раствора кислого фуксина 25мл раствора метаванадата аммония) 30 сек. – 1 мин, промывали в дистиллированной воде, промывали в 0.01% растворе буры - 10-20 сек (необязательно), промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в восходящих концентрациях этанола (70%, 96%, абс. х 2), осветляли в ксилоле (х 2) и монтировать под покровное стекло в Канадском бальзаме [136].

Для изучения состояния сосудистого русла использовали метод наливки сосудов тушью [33]. Животных под хлоралгидратным наркозом транскардиально перфузировали последовательно физиологическим раствором 100мл и профильтрованной тушью 100мл (рис. 7 а,б)

Рис. 7 а. Транскардиальная перфузия последовательно физиологическим раствором (а) и профильтрованной тушью (б).

Рис. 7 б. Транскардиальная перфузия последовательно физиологическим раствором (а) и профильтрованной тушью (б).

Позвоночник фиксировали модифицировнным фиксатором Теллесницкого [19] смесью формалин-спирт-уксусная кислота ФУС в пропорции 2:7:1 погружением 2-2,5 ч. Извлекали фиксированный спинной мозг (Рис. 8) и резали.

Рис. 8. Суправитальная транскардиальная перфузия сосудов тушью (фокальный ишемический очаг показан стрелкой).

Для визуального определения размеров очага ишемического повреждения нефиксированный спинной мозг окрашивали в 1%-ном растворе трифенилтетразолий хлорида (ТТС - Sigma , Cat. № T 8877) в течение 40 - 45 мин. при 37° С.

ТТС окрашивает только неповрежденную ткань мозга и не окрашивает очаг ишемического некроза (Рис. 9).

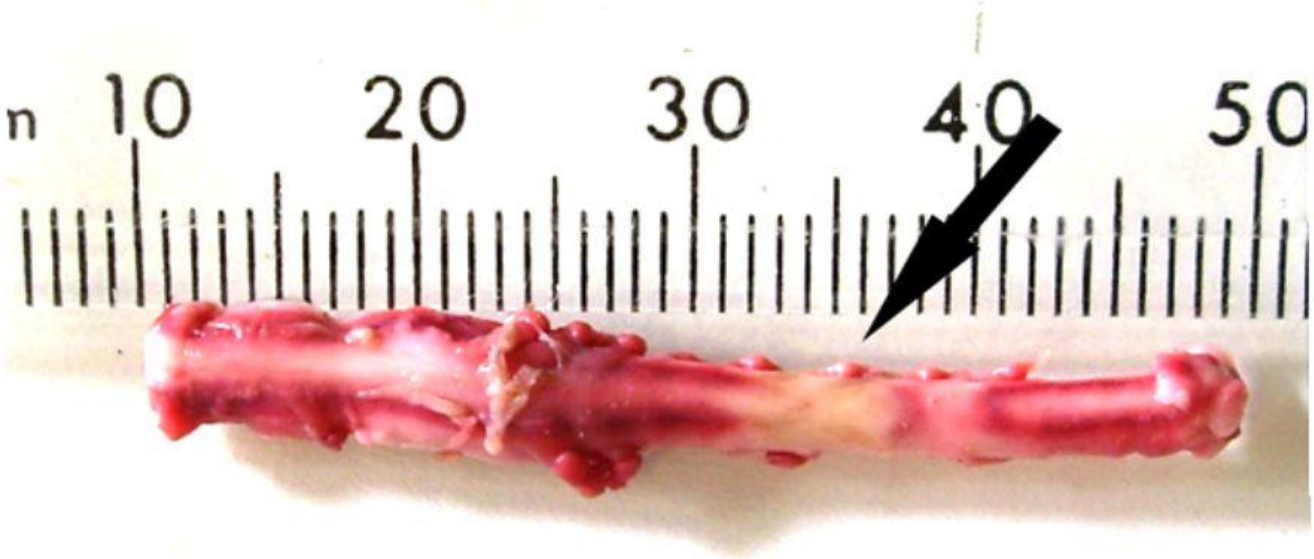


Рис. 9 Окраска нефиксированного спинного мозга трифенил-тетразолий-хлоридом (ТТХ) (фокальный ишемический очаг показан стрелкой).

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) (рис. 10).

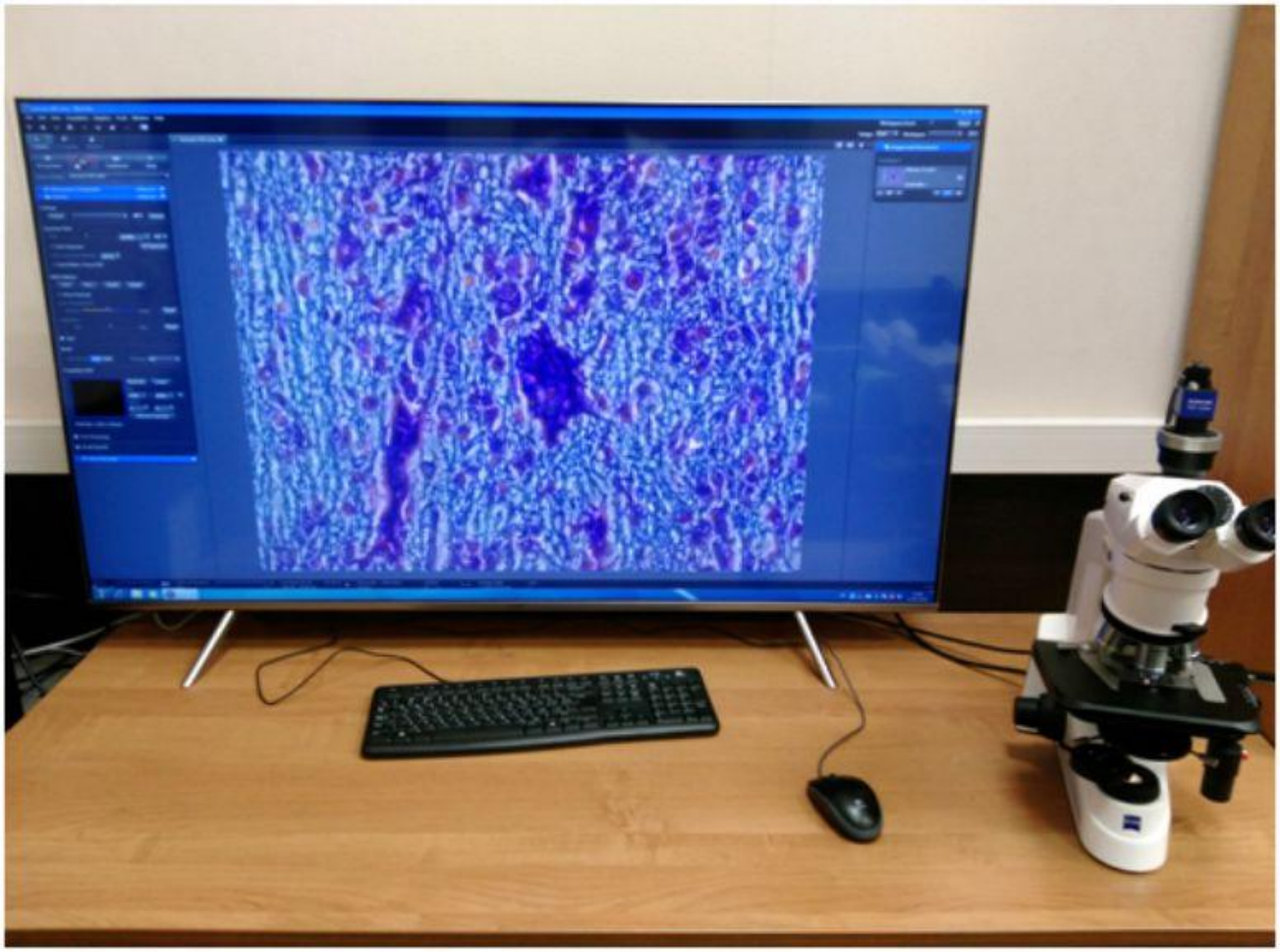


Рис. 10. Установка для проведения автоморфометрии.

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.

2.2.2. Исследование изменения непроизвольных, врожденных реакций для анализа нарушений моторных функций.

Провести объективную количественную оценку поведенческих реакций у послеоперированных животных с помощью тестов, применяемым к интактным животным, оказалось проблематично. К примеру, у крыс с полным или частичным парезом задних конечностей трудно количественно оценить двигательную активность в «открытом поле», а о количественной оценке ее вертикальной составляющей вообще не могло идти речи. Затруднения возникли даже при оценке рефлексов сгибания, хватания и др., т.к. движения конечностей при выполнении этих тестов были иногда настолько замедленными, что однозначно установить наличие или отсутствие реакции было невозможно. Использование в данной работе аппаратуры, регистрирующей суммарную мышечную активность, представлялось нецелесообразным, поскольку этот показатель далеко не всегда коррелирует с показателями функционального состояния объекта исследования.

Для оценки нарушений моторных функций использовались непроизвольные, врожденные реакции. Животные перед экспериментом систематически приучались к рукам в течение нескольких дней. Их доставали из клетки, клали на стол, гладили, поднимали, перемещали с одного места на другое, не вызывая никаких болевых или отрицательных реакций у животных.

Тестирование врожденного поведения имеет то преимущество, что оно может производиться на необученных животных без сложного оборудования.

Рефлекс сгибания: животное поднимали за кожу спины и ущемляли пальцы задних конечностей пинцетом, покалывали ступню иглой или прикасались к подушечкам пальцев горячим металлическим прутом (60°С). В норме ступня немедленно отдергивается и сгибание ненадолго сохраняется. Интенсивность реакции пропорциональна интенсивности стимула.

Отдергивание хвоста: болевой рефлекс отдергивания, определяемый на уровне спинного мозга. Животное помещали в горизонтально расположенный цилиндр соответствующих размеров. Световой пучок большой интенсивности,

генерируемый лампой, фокусировали на хвосте до тех пор, пока не происходит отдергивания хвоста (т. е. когда температура кожи достигала критического уровня). При постоянных параметрах стимула фиксировался латентный период реакции.

Рефлекс хватания: крысу держали навесу и давали ей слегка прикоснуться лапой к жесткой проволоке (1 мм в диаметре). В норме хватание осуществляется путем сгибания пальцев животного вокруг проволоки. Реакция усиливается при попытке убрать проволоку.

Рефлексы позы (переворачивания): (а) животное клали на спину, на плоскую поверхность. В норме оно сразу же восстанавливает исходное положение, переворачивается (становится на четыре лапы), (б) крысу клали на спину и фиксировали голову рукой. В норме переворачивание начинается с задних конечностей [111].

Реакция постановки лапы на опору: поднятую крысу передвигали горизонтально так, чтобы тыльная сторона конечностей касалась края стола. В норме лапа сразу же ставится на поверхность стола.

Растопыривание пальцев задних лап: крысу помещали на лист плексигласа, закрепленного над зеркалом, что позволяло наблюдать за положением пальцев задних лап животного. В норме, когда происходит внезапный наклон или движение платформы вверх или вниз, пальцы лап животного разгибаются и растопыриваются.

Анализировалась активность, правильность постановки лап, положение тела и хвоста при движении крыс по решетке наклоненной на 30%.

В данной работе количественная и объективная оценка поведенческих реакций у экспериментальных крыс проводилась по интегральному показателю [24; 25], основанному на модификации различных методов. Критериями для установления интегрального показателя служили несколько параметров состояния животных, которые регистрировались в ходе исследования. Каждый критерий оценивался определенным баллом (табл. 2.1).

Таблица 2.1 – Шкала оценки поведенческих реакций у крыс по интегральному показателю в баллах

Критерии оценки	Балл
Двигательная активность, реакция на раздражитель конечностей, хвоста и рефлекс позы отсутствуют	0
Двигательная активность отсутствует, нет реакции на раздражитель задних конечностей и хвоста, но сохранен рефлекс 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 задних конечностей	4
Восстановление функции задних конечностей, но замедленная 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 [28]. 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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.

3.1. Морфологическое исследование.

3.1.1. Макроскопическая характеристика фокальных очагов ишемического повреждения спинного мозга.

Через 24 часа после воспроизведения фокальной ишемии в срезах нефиксированного спинного мозга окрашенных 1%-ым раствором трифенил-тетразолий-хлорида (ТТХ), выявлялся интактный к красителю ТТХ фокальный ишемический очаг, размерами захватывающий почти весь поперечник спинного мозга (Рис.11).

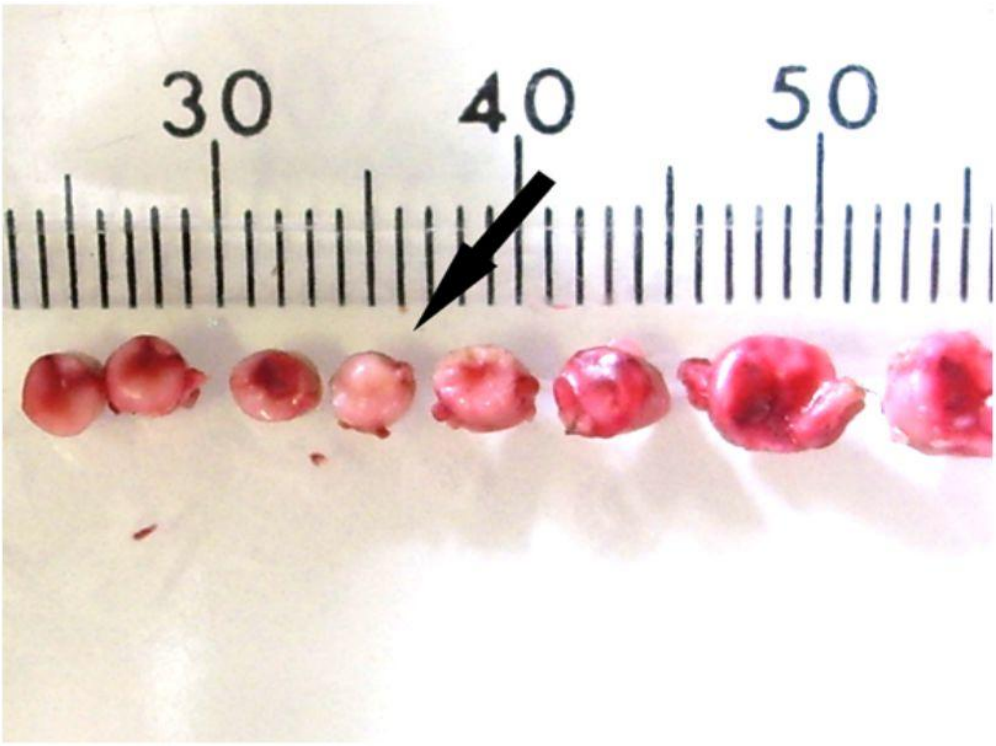


Рис. 11. Поперечные срезы нефиксированного спинного мозга окраска трифенил-тетразолий-хлоридом (ТТХ). Фокальный ишемический очаг показан стрелкой.

3.1.2. Гистологическая характеристика фокальных очагов ишемического повреждения спинного мозга.

На гистологических срезах, окрашенных крезиловым фиолетовым прочным по методу Ниссля, на 1-е сутки после вызванной ишемии выявляется локальная зона с признаками некроза, которая практически не окрашивается. На данном этапе структура спинного мозга еще сохраняется, однако некротические изменения уже выявляются в структуре нейронов. При нарастающем снижении кровоснабжения, вызванном фотостимулируемым тромбозом, среди нейронов обнаруживаются клетки с ишемическим изменением и гомогенизирующим некрозом, где наряду с простым цитолизом и острым набуханием обнаруживаются нейроны с гиперхроматозом и тяжелыми деструктивными изменениями [21; 24] (Рис.12).

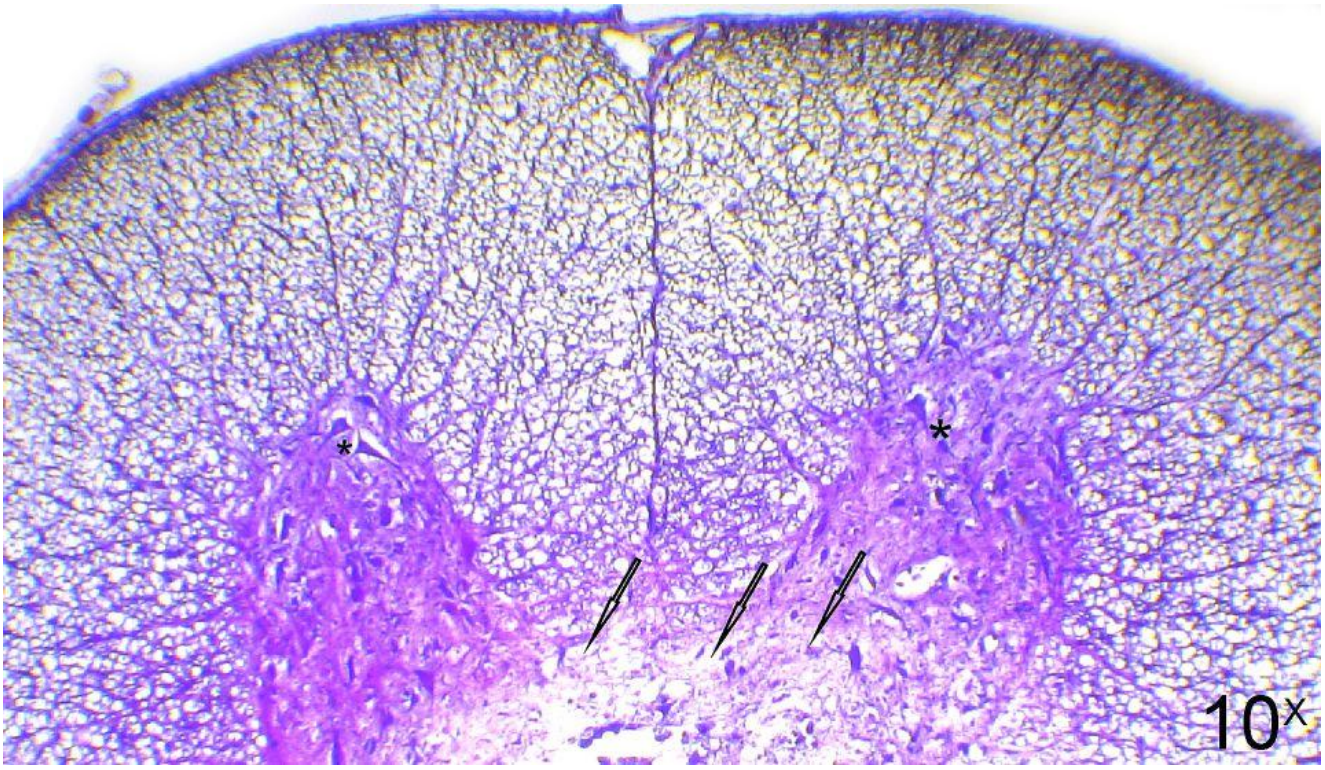


Рис. 12. Острые патоморфологические изменения в фокальной зоне некроза (фотоиндуцированный тромбоз).

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 10Х

В этот период в пограничной с некротическим очагом зоне - в области перифокального повреждения - пенумбре, помимо отека, отмечаются острые изменения нейронов: острое набухание, кариоцитолиз, клетки-тени, встречаются

также единичные клетки с ишемическим изменением (Рис.13).

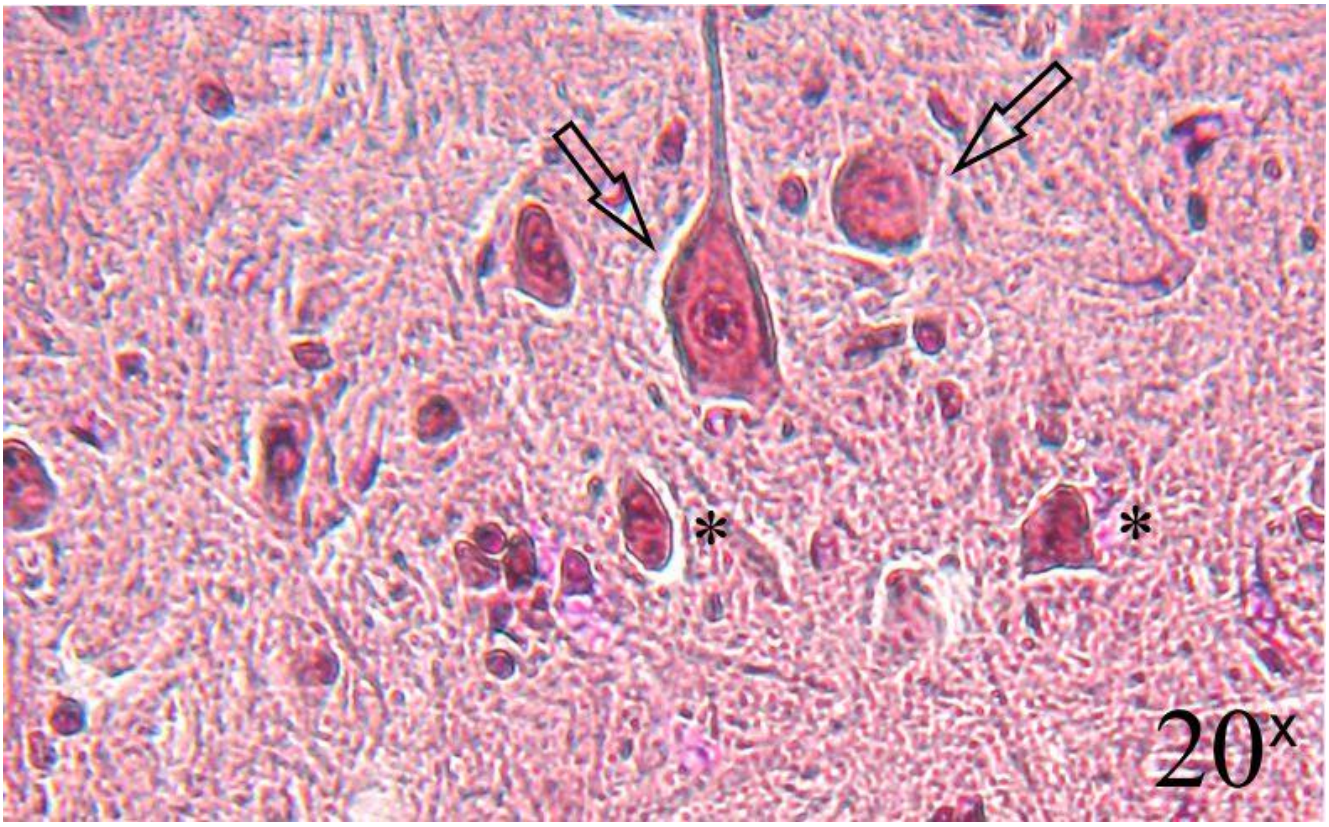


Рис. 13. Патоморфологические изменения нейронов (в области перифокального повреждения) - пенумбра (фотоиндуцированный тромбоз).

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 20Х

На гистологических срезах, окрашенных люксолевым прочным синим с докрашиванием крезиловым фиолетовым прочным, в нейронах выявлены типичные ишемические изменения, такие как угловатая форма нейрона, гомогенизация цитоплазмы и исчезновение глыбок хроматина (Рис.14).

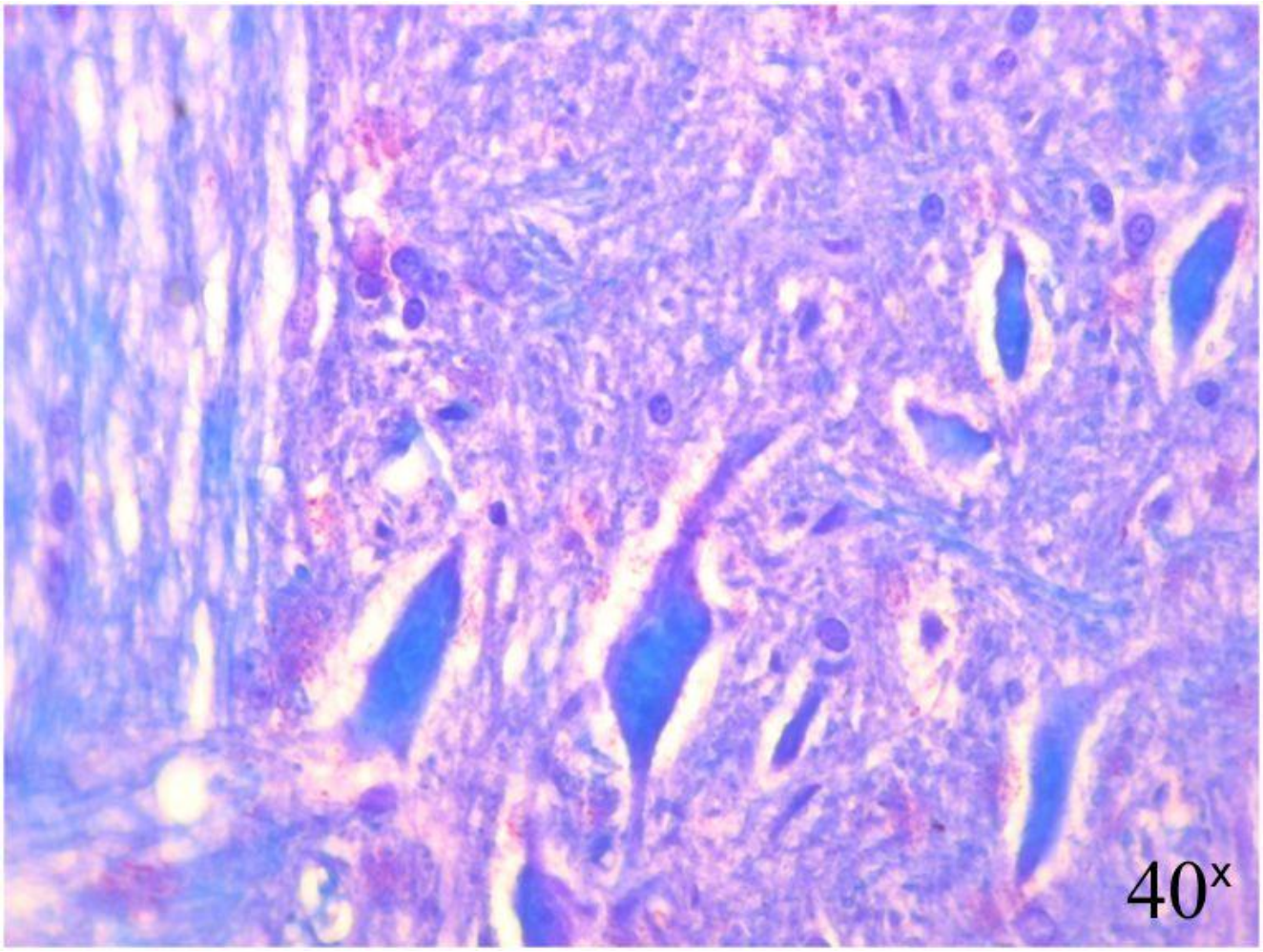


Рис. 14 Патоморфологические изменения нейронов - пенумбра (фотоиндуцированный тромбоз).
Тяжелые ишемические повреждения нейронов, ядра не выявляются, угловатая форма нейрона, гомогенизация цитоплазмы и исчезновение глыбок хроматина, сильный перицеллюлярный отек.
Окраска люксолевым прочным синим с докрашиванием крезиловым фиолетовым прочным. Увеличение 40Х

Через неделю после вызванной ишемии в результате воздействия протеолитических ферментов в центральной зоне ишемического очага происходит деструкция всех клеточных элементов (паннекроз) (Рис.15).

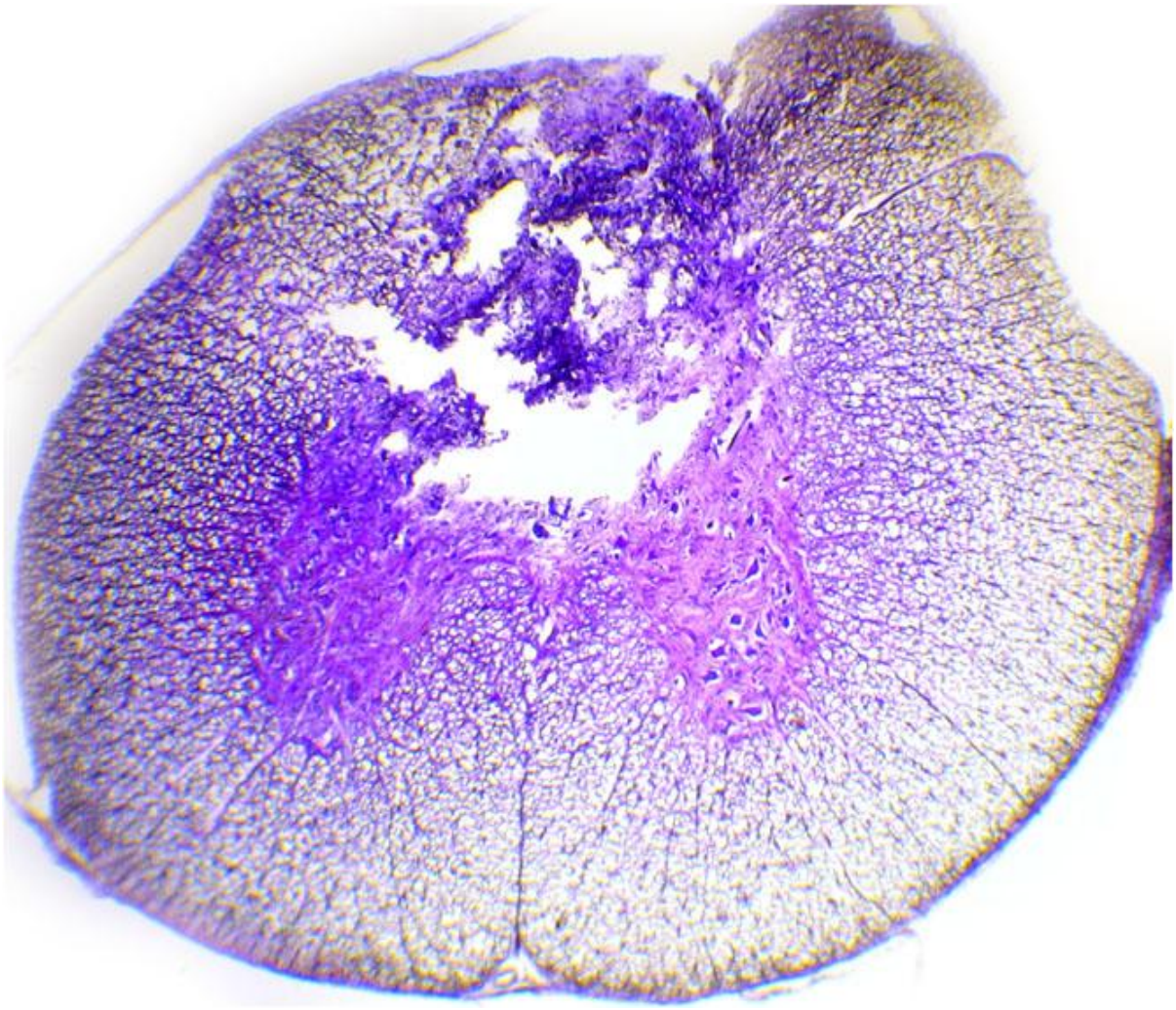


Рис. 15. Некротические изменения в очаге ишемии (фотоиндуцированный тромбоз). Зона паннекроза и формирующийся кисты. Окраска крезиловым фиолетовым прочным по методу Ниссля. Увеличение 2,5Х

В окружающей очаг зоне (пенумбре) к этому сроку уже 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.16).

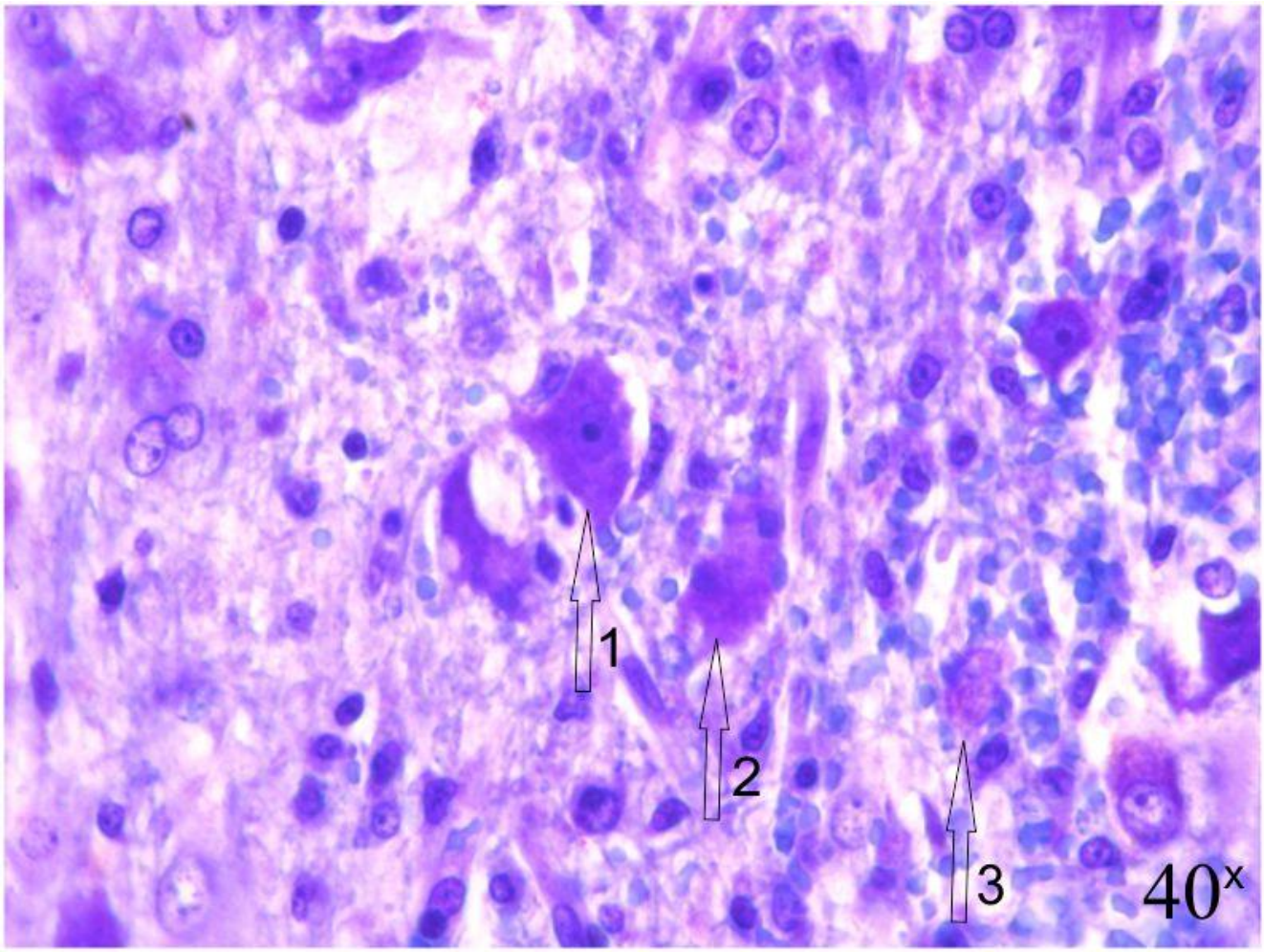


Рис. 16. Пролиферация и гипертрофия астроцитов - пенумбра (фотоиндуцированный тромбоз).

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 расплывчаты, 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 докрашиванием крезиловым фиолетовым прочным. Увеличение 40Х

В удаленной от очага зоне (окружающей пенумбру) наряду с погибшими клетками присутствуют нормальные неизмененные нейроны (Рис. 17), а также гиперхромные нейроны, которые на более поздних сроках могут восстанавливаться, или погибают.

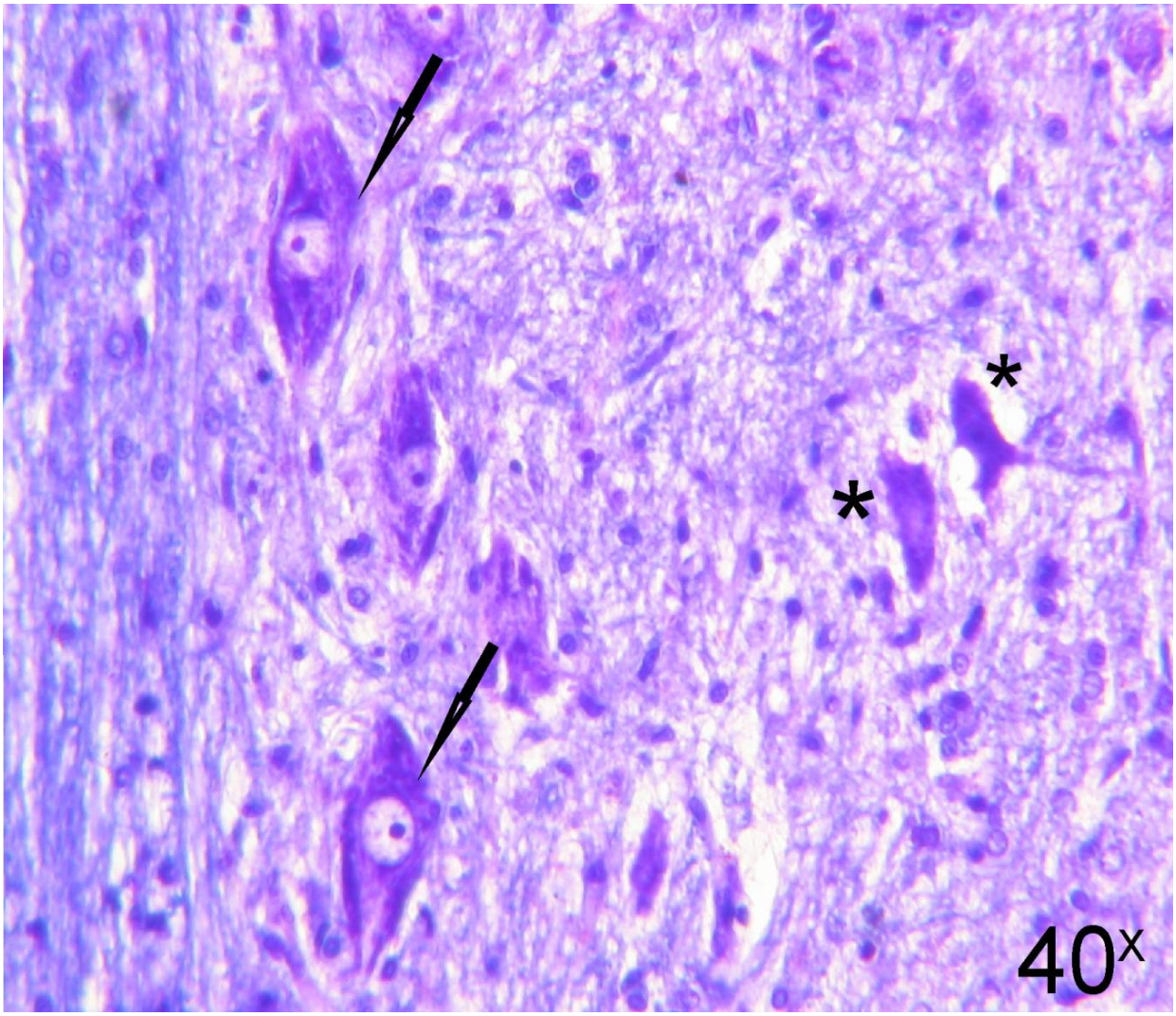


Рис. 17. В удаленной от очага зоне, на 6 сутки после операции (фотоиндуцированный тромбоз).

1.- гиперхромные нейроны, с перицеллюлярным отеком (звездочки).

2.- нормальные нейроны, с центрально расположенными светлыми ядрами, в цитоплазме которых хорошо выражены глыбки хроматина (стрелки).

Окраска Люксолевым прочным синим с докрашиванием крезиловым фиолетовым прочным. Увеличение 40Х

Через неделю после вызванной ишемии на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином по Маллори, в зоне очага некротического поражения выявляется образование глиально-соединительнотканного рубца, окончательное формирование которого происходит к концу 3-ей недели после ишемического повреждения.

Для выявления нормальных и поврежденных вызванной ишемией нейронов в качестве ацидофильного красителя использовался ванадиевый кислый фуксин, а в качестве базофильного толуидиновый синий. При окрашивании нормальных нейронов ванадиевый кислый фуксин выкрашивал только ядрышко, остальные структуры нейрона окрашивались толуидиновым синим (рис.18).

Если ванадиевый кислый фуксин окрашивал всю цитоплазму поврежденных вызванной ишемией нейронов, то это означало, что такие нейроны перенесли необратимое ишемическое повреждение [24]. Таким образом, ванадиевый кислый фуксин позволял на срезах идентифицировать необратимую деструкцию в виде ацидофильных нейронов (рис.19). Толуидиновым синим окрашивалась цитоплазма (гиперхромные нейроны). Окрашенные таким образом нейроны, еще способны в постишемическом периоде восстановиться до нормальных.

В основу количественной оценки морфологических изменений была положена методика, предложенная А.В. Свищевым [34]. Предложенные автором формулы для вычисления тяжести поражения в центральной нервной системе достаточно объективно отражают характер патологических изменений.

Соотношение клеток с разной степенью повреждения и разных зонах представлены в таблицах 3.1-3.3.

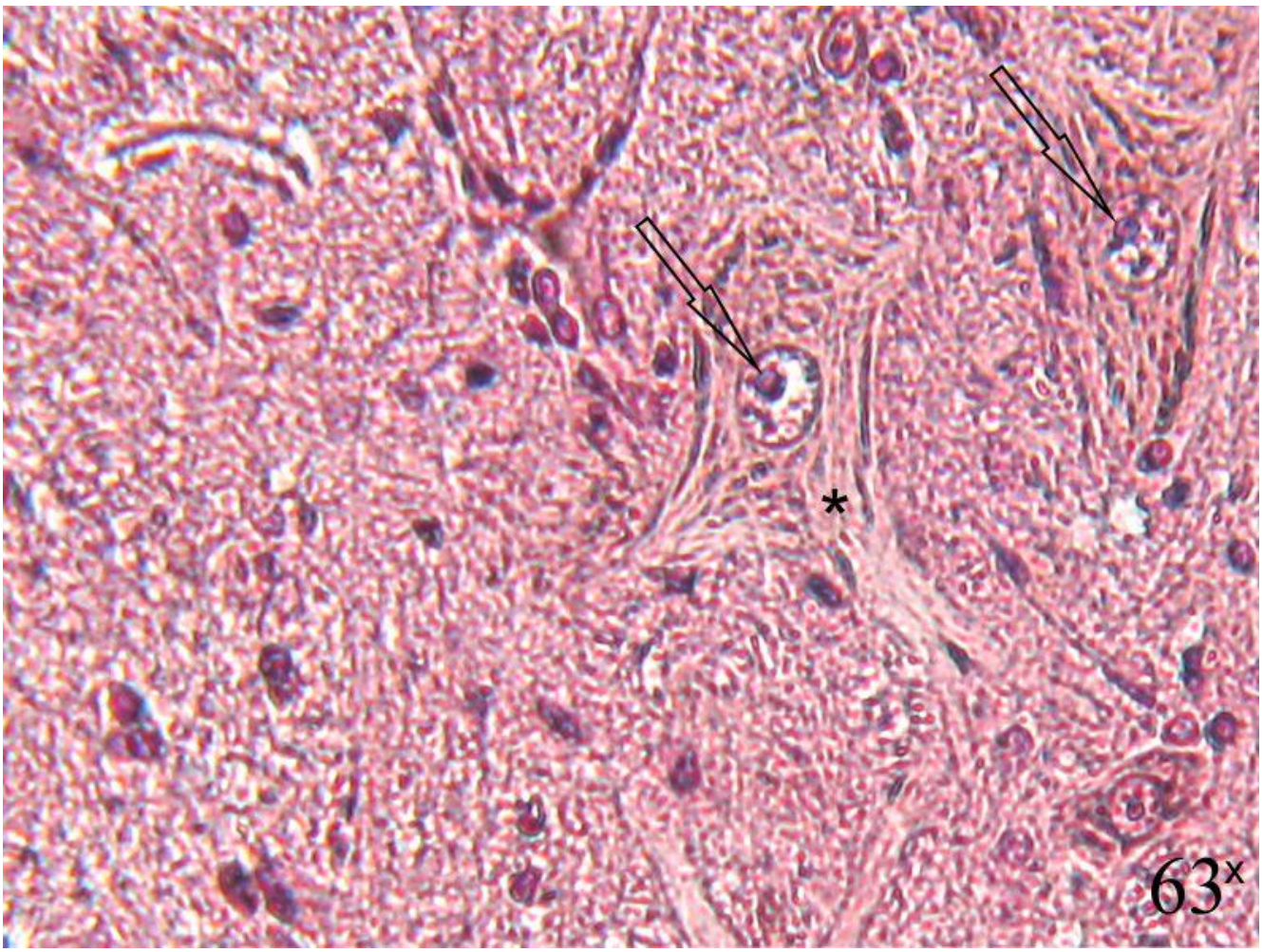


Рис. 18. В удаленной от очага зоне, на 9 сутки после операции (фотоиндуцированный тромбоз).

1.- нормальные нейроны ванадиевый кислый фуксин выкрашивал только ядрышко (стрелки).

2.- остальные структуры нейрона окрашивались толуидиновым синим (звездочка).

Окраска гематоксилином ванадиевым кислым фуксином. Увеличение 63Х

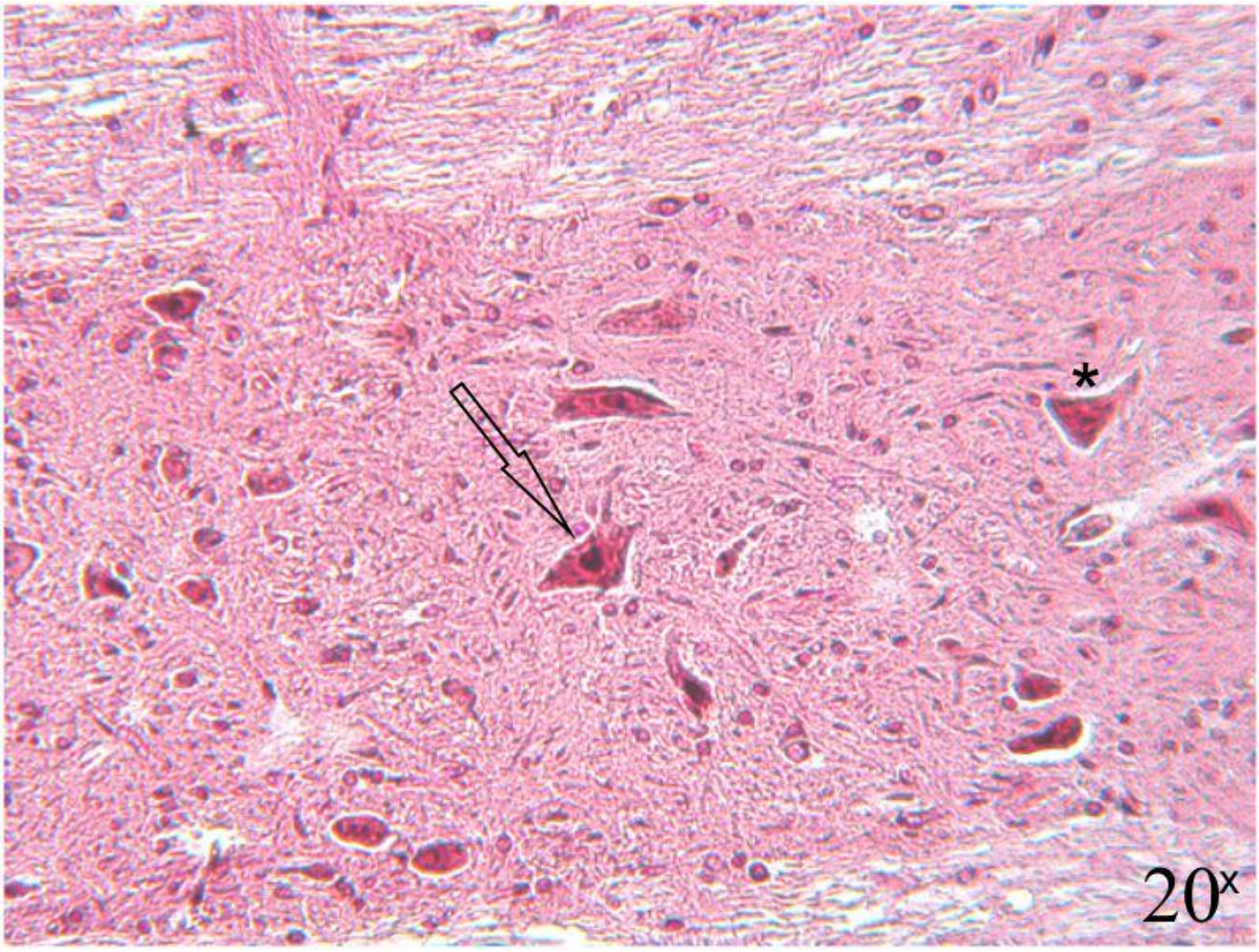


Рис. 19. Ишемическое повреждение нейронов - пенумбра на 9 сутки после операции (фотоиндуцированный тромбоз).

1.- ацидофильный нейрон, в котором выявляется темное сморщенное пикнотичное ядро (стрелка).

2.- ацидофильный нейрон, тело сморщенно, деформированно, ядро не выявляется (звездочка).

Окраска гематоксилином ванадиевым кислым фуксином. Увеличение 20Х

Таблица 3.1 – Количество клеток (в %) с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза в зоне некротического очага ($\dot{x} \pm s$)

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 3.2 – Количество клеток (в %) с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза в зоне пенумбры ($\dot{x} \pm s$)

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 3.3 – Количество клеток (в %) с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза в удаленной от очага зоне ($\dot{x} \pm s$)

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

Как следует из таблиц, на первые сутки после воздействия заметные изменения гистологических показателей отмечались только непосредственно в

зоне некротического очага. Через неделю последействия, 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. 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 формировался глиально-соединительнотканный рубец.

Для оценки функциональной активности нейронов были проведены измерения площади ядрышек в удаленной от очага повреждения зоне. Динамика данного показателя представлена в табл. 3.4.

Таблица 3.4 – Изменения размера ядрышек нейронов (мкм^2) в разные сроки после воздействия ($\dot{x} \pm s$)

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**

***Примечание:* * – различия при сравнении с контролем статистически значимы ($p<0,05$); ** – различия при сравнении с контролем статистически значимы ($p<0,01$)**

Как видно из таблицы через неделю после воздействия площадь ядрышек нейронов «опытной» группы была достоверно ниже, чем в «контроле», 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», а ядра осветляются. Обнаруживаются нейроны с двумя ядрышками.

3.2. Изменение моторных функций при фокальном ишемическом повреждении грудного отдела спинного мозга.

В данном разделе работы на модели фотоиндуцированного тромбоза были проведены исследования с целью сопоставления динамики развития деструктивных и репаративных процессов в фокальном очаге ишемического повреждения с нарушением и восстановлением моторных функций ЦНС.

Показано, что фокальное ишемическое повреждение грудного отдела спинного мозга вызывает выраженные изменения моторных функций.

На первые сутки после воздействия животные опытной и контрольной групп мало отличались друг от друга, что выражалось в снижении общей двигательной активности, замедлении реакций на внешний раздражитель. Это объяснялось эффектом наркоза, болевого эффекта после перенесенных оперативных воздействий. В целом, отмечалась тенденция к снижению показателей поведенческих реакций относительно фона в обеих группах. Однако в дальнейшем, показатели поведенческих реакций контрольных крыс быстро восстанавливались до исходного уровня, а у животных опытной группы стали лавинообразно развиваться признаки явной патологии. Это проявлялось, прежде всего, в нарушении координации движений, снижении двигательной активности, развитии пареза задних конечностей.

В течение первой недели последействия патологические изменения у животных опытной группы достигли максимума, вплоть до гибели отдельных особей. Животные практически утратили двигательную активность, их задние конечности и хвост были парализованы. У выживших крыс, начиная с этого момента, начался этап постепенного восстановления функционального состояния.

Через две недели восстановительного периода в опытной группе, на фоне выраженного пареза задних конечностей и хвоста было отмечено повышение двигательной активности (за счет деятельности только передних конечностей) слабые реакции задних конечностей на внешний раздражитель – сокращения отдельных мышц без видимого движения конечностей, а у отдельных особей – замедленные движения конечностей.

Спустя месяц после операции, задние конечности животных начали воспроизводить движения, сходные с нормальными. Однако это была имитация восстановления их функции. Животные не опирались на задние конечности, лапы не цеплялись за поверхность площадки, а скользили по ней, не приподнимая заднюю часть тела над площадкой. В этот период сгибательный и другие рефлексы были сильно замедлены.

Примерно через два месяца после воспроизведения фокальной ишемии у животных происходило восстановление показателей поведенческих реакций. При визуальном осмотре, крыс опытной группы внешне было трудно отличить не только от контрольных, но и от интактных.

Применение описанного выше интегрального показателя позволило количественно представить динамику изменений поведения животных в разные сроки наблюдения и провести статистическую обработку полученных данных (табл. 3.5). Максимальное снижение показателей моторных функций наблюдалось через неделю после ишемического воздействия [24]. У ложнооперированных животных заметных изменений моторных функций в те же сроки не наблюдалось.

Таблица 3.5 – Динамика изменений интегрального показателя поведенческих реакций крыс до (фон) и после операции по моделированию фотоиндуцированного тромбоза спинного мозга ($\dot{x} \pm s$)

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

***Примечание:* * – различия при сравнении с контролем статистически значимы (p<0,05); ** – различия при сравнении с контролем статистически значимы (p<0,01)**

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

животных. При этом установлена корреляция между изменением моторных функций и морфологических показателей в постишемическом периоде: образованием и формированием очага некроза и началом восстановительных процессов (табл. 3.1-3.3).

3.3. Фармакологическая коррекция последствий ишемического повреждения грудного отдела спинного мозга.

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 в разделе 2, всегда вводилась через 1 час после световой экспозиции.

3.3.1. Нейростимулирующий эффект ноопепта.

В таблице 3.6 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 3.6 – 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 ($\dot{x} \pm s$)

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

***Примечание:* * – различия при сравнении с контролем статистически значимы ($p<0,05$); ** – различия при сравнении с контролем статистически значимы ($p<0,01$)**

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 [28].

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.20), а объем очага ишемического повреждения у животных, получавших ГВС-111, был в среднем в 2 раза меньше по сравнению с группой «опыт 1» (рис. 21).

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. 3.7).

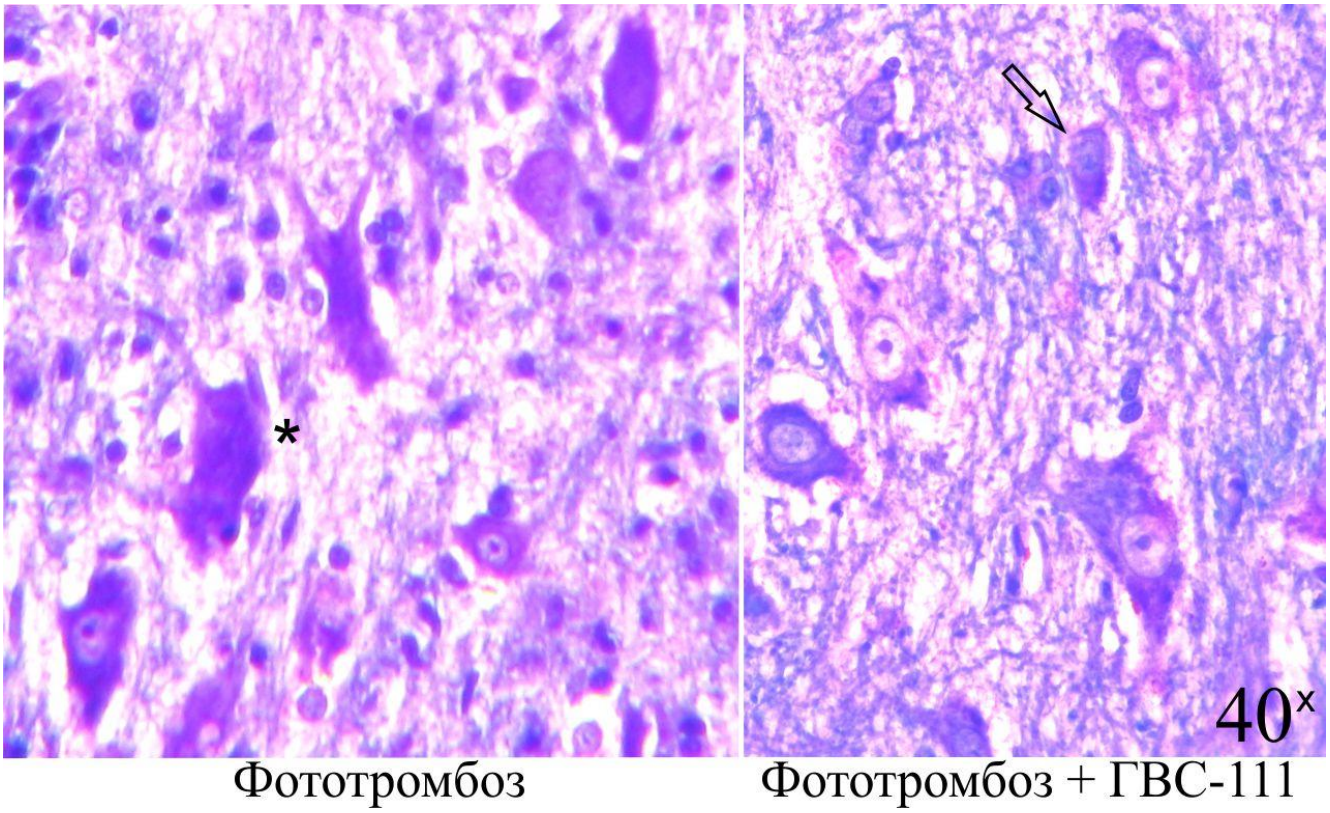


Рис. 20. Ишемическое повреждение нейронов (фотоиндуцированный тромбоз,
фотоиндуцированный тромбоз + нейростимулирующий эффект ноопепта).
1.- нейрон, в котором выявляется темное сморщенное пикнотичное ядро (стрелкака).
2.- нейрон, тело сморщенно, деформированно, ядро не выявляется (звездочка).
Окраска Люксолевым прочным синим с докрашиванием крезиловым фиолетовым прочным. Увеличение 40Х

Рис. 21. Фотоиндуцированный тромбоз, фотоиндуцированный тромбоз + нейростимулирующий эффект ноопепта). Окраска нефиксированного спинного мозга трифенил-тетразолий-хлоридом (ТТХ) (фокальный ишемический очаг показан стрелкой).

Таблица 3.7 – Количество клеток (в %) в зоне пенумбры с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза у крыс без использования (опыт 1) и с использованием (опыт 2) ноопепта ($\dot{x} \pm s$)

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

Как следует из табл. 3.7, 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.

Менее выраженными были и изменения функциональной активности нейронов у животных группы «опыт 2», оцениваемые по площади ядрышек (табл. 3.8).

Таблица 3.8 – Сравнительная оценка динамики изменений размеров ядрышек нейронов (мкм^2) у крыс без использования (опыт 1) и с использованием (опыт 2) ноопепта ($\dot{x} \pm s$)

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

***Примечание:* * – различия при сравнении с контролем статистически значимы ($p<0,05$); ** – различия при сравнении с контролем статистически значимы ($p<0,01$)**

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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использованный метод фотоиндуцированного тромбоза подтвердил адекватность моделирования ишемического повреждения грудного отдела спинного мозга в ходе продолжительных (2 месяца) морфофункциональных исследований восстановительного периода.

Метод фотоиндуцированного тромбоза позволяет моделировать локальный очаг ишемического повреждения спинного мозга, в котором нервные клетки не сохраняются. В этой области постепенно формируется глио-соединительнотканный рубец. Вокруг очага формируется перифокальная зона – пенумбра, в которой кроме необратимо поврежденных нервных клеток, выявляются неповрежденные, а также нейроны, сохраняющие потенцию к восстановлению. Таким образом, общая картина морфологических изменений при использовании метода фотоиндуцированного тромбоза соответствует реальному ишемическому повреждению [140; 141; 46].

Восстановление моторных функций после вызванного ишемического повреждения на фоне значительного поражения клеточных структур осуществлялось за счет повышенной функциональной активности уцелевших нервных клеток, о чем свидетельствует увеличенный размер ядрышек нейронов. Это согласуется с данными литературы о вовлечении в процесс восстановления моторных функций в постишемическом периоде резервных нейронов [142; 27].

В ходе работы была выявлена возможность стимуляции не только восстановления моторных функций, но и сохранности нервной ткани экспериментальных животных после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга. Результаты проведенных исследований показали, что очаг ишемического повреждения структур спинного мозга у животных группы «опыт 2» (вводился нейростимулятор) был визуально меньше, чем у группы «опыт 1». Летальность животных группы «опыт 2» снизилась примерно в 5 раз относительно группы «опыт 1». Сохранность нейронов у животных группы «опыт 2» была значительно выше, чем у животных группы «опыт 1». Так число неизмененных нейронов в пограничной с очагом ишемического поражения зоне

через неделю постишемического периода в группе «опыт 2» было в среднем почти в 4 раза выше, чем в группе «опыт 1», а количество нейронов с необратимыми изменениями в группе «опыт 1» в среднем более чем в 3 раза превышало аналогичный показатель в группе «опыт 2». Восстановление моторных функций у животных группы «опыт 2» происходило значительно быстрее по сравнению с группой «опыт 1» и уже через 2 недели восстановительного периода интегральный показатель поведенческих реакций у группы «опыт 2» приближался к контролю, в то время как такой же результат у животных группы «опыт 1» достигался спустя 1,5 месяца.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют признать эффективность ноопепта (ГВС-111) в качестве нейростимулятора процессов регенерации после вызванной ишемии грудного отдела спинного мозга.

Следует отметить, что поскольку функциональная активность сохранившихся нейронов у животных группы «опыт 1» через 2 месяца последействия была достоверно выше ($p<0,01$) чем в контроле, а у животных группы «опыт 2» данный показатель не отличался от контроля, можно говорить о преобладании компенсаторных процессов в восстановительном периоде у животных, которым не вводился ноопепт.

На первый взгляд кажется странным, что при ишемическом повреждении грудного отдела спинного мозга наблюдается парез задних конечностей опытных животных, однако повреждения нейронов серого вещества грудного отдела, отек не могут не отразиться на функциональном состоянии проводящей системы спинного мозга и, как следствие, вызвать нарушения моторных функций в нижележащих отделах. При этом, отсутствие реакций задних конечностей на раздражитель может свидетельствовать о развитии дисбаланса в проводящей системе с преобладанием, очевидно, тормозных сигналов.

Как показали результаты проведенных исследований, через неделю постишемического периода наблюдается наиболее сильная реакция, как со стороны поведенческих реакций, так и гистологических показателей. Пролонгированный характер действия ишемического повреждения

подтверждается данными литературы [52; 70; 88; 110; 121; 122; 150]. Вполне закономерно, что в ответ на снижение гистологических показателей на шестые сутки последействия, отмечается заметная реакция и показателей поведенческих реакций. Но обращает на себя внимание тот факт, что через два месяца после моделирования ишемии спинного мозга, на фоне практически полного восстановления функционального состояния центральной нервной системы, регистрируемого по результатам исследования поведенческих реакций, показатели гистологических исследований у животных группы «опыт 1» остаются пониженными, относительно контроля.

При этом гистологические показатели у опытных животных, которым не вводился корректирующий препарат, практически в 2 раза ниже, чем у животных, получавших нейропротектор (рис. 22), однако в этот период обе группы опытных животных не обнаруживают заметной разницы в поведенческих тестах относительно контроля и фона.

Можно предположить следующий механизм этого феномена. При гибели нервных клеток вследствие ишемии и нарушении деятельности нейронных цепей, восстановление функций ЦНС происходит за счет резервных нейронов. Образующиеся новые нейронные цепи не могут функционировать полноценно, пока сохраняются неповрежденные ишемией клетки исходных нейронных цепей, сохраняющие синаптические связи с мотонейронами и вводящими дисбаланс в суммарный мембранный потенциал мотонейронов. Как защитный механизм, запускается процесс апоптоза интактных клеток поврежденных нейронных цепей. Не исключено, что нейропротекторное действие физических факторов (гипоксии, гипотермии) при ишемии частично обусловлено поражающим действием, прежде всего, на ослабленные интактные клетки поврежденных нейронных цепей и ускорением процесса их гибели. В результате чего достигается более быстрое включение в нормальную деятельность новых резервных нейронных цепей.

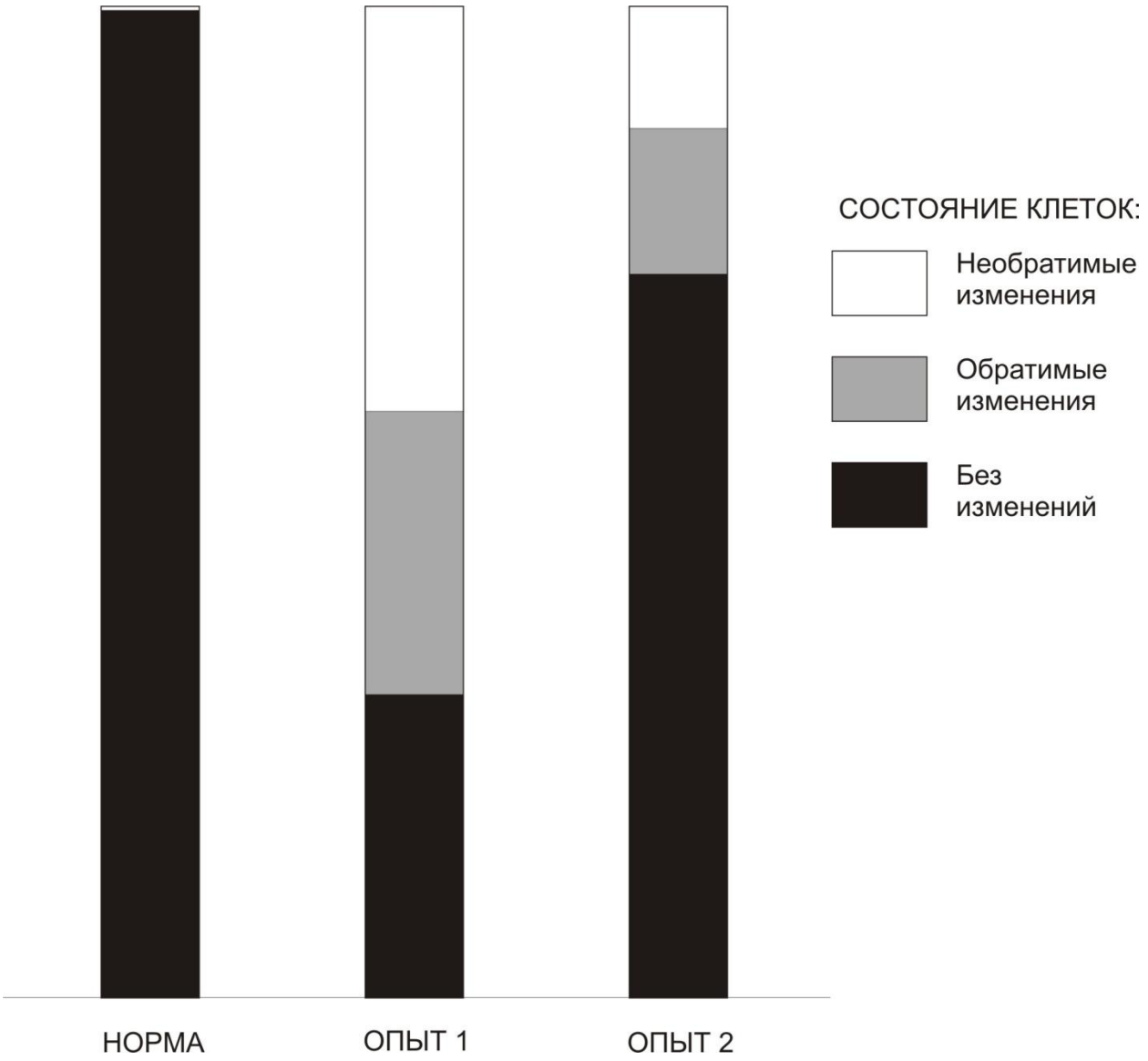


Рис. 22. Количественное соотношение нейронов (в %) с разной степенью повреждения в области пенумбры через 2 месяца после моделирования у крыс ишемии грудного отдела спинного мозга (средние данные).

Основными патогенетическими звеньями ишемического повреждения головного мозга являются: медиаторный дисбаланс с гиперактивацией рецепторов ВАК - глутаматная нейротоксичность, приводящая к гибели нейронов; дестабилизация ионного гомеостаза - накопление избыточного внутриклеточного кальция, вызывающее повреждение структуры мембран нейронов; активация ПОЛ - накопление ТБК-реактивных продуктов, диеновых коньюгатов и шиффовых оснований. В последние годы получены доказательства эффективности ГВС-111 в отношении этих звеньев. Так в исследованиях Н.А. Андреевой и др. [2; 3]

показано, что ГВС-111 снижает количество погибших нейронов в культурах клеток мозжечка, подвергшихся действию токсических доз глутамата, кислородно-глюкозной депривации, оксидативному стрессу. В экспериментах на изолированных нейронах виноградной улитки ГВС-111 блокировал потенциал-зависимые кальциевые каналы [124]. Установлено также, что ГВС-111 предотвращает выраженные нарушения перекисного окисления липидов, вызванные иммобилизационным стрессом [20], и оказывает антиоксидантное действие, уменьшая степень накопления ТБК-реактивных продуктов в мозгу мышей, генетически предрасположенных к стрессу. Хотя в целом полученные данные и позволяют заключить, что ГВС-111 действует нормализующим образом на некоторые ключевые механизмы клеточной патологии, остается не ясным, являются ли они первичной мишенью действия этого ноотропа или он препятствует каким-то метаболическим реакциям, последовательно запускающим эти механизмы.

Приведенные данные о нейрохимических свойствах ГВС-111 в сочетании с полученными результатами о его нейростимулирующим действии при ишемическом повреждении грудного отдела спинного мозга указывает на перспективность использования этого соединения для коррекции постишемических нарушений деятельности ЦНС.

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.

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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано использовать автоморфометрический метод, позволяющий повысить эфективность 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

1. AMPA – альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионат
2. AMPA-рецептор – рецептор глутамата, селективно связывающий AMPA
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

СПИСОК ТЕРМИНОВ

Автоморфометрия

Инвазивный

Ишемия

Нейромедиатор

Нейрометаболический стимулятор (ноотроп)

Нейропротектор

Фотоиндуцированный тромбоз

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аврова Н.Ф., Викторов И.В.,Тюрин В.А., Андреева Н.А. Защитное действие ганглиозидов против нейротоксического эффекта глутамата. Роль свободнорадикальных процессов. Нейрохимия., 1996; 13; 2: 103-109.
2. Андреева Н.А., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Островская Р.У., Гудашева Т. А., Викторов И.В. Исследование защитного действия пептида ГВС-111 при моделировании гипоксии in vitro. Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. Материалы Второй Всерос. конференции. М., 1999: 5.
3. Андреева Н.А., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Викторов И.В. Нейропротективные эффекты ноотропного дипептида ГВС-111 при кислородно-глюкозной депривации, глютаматной токсичности и оксидативном стрессе in vitro. Бюл. Эксперим. биол. и мед. 2000.
4. Барсков И.В., Викторов И.В. Локальный компрессионный инфаркт коры головного мозга крыс как экспериментальная модель фокальной ишемии. Патол. физиол.и эксперим.терапия., 1994; 2: 57-59.
5. Болдырев А.А. Двойственная роль свободнорадикальных форм кислорода в ишемическом очаге. Нейрохимия., 1995; 12; 3: 3-13.
6. Болякина Г.К., Еникеева Д.А., Каменская М.А. Механизмы и возможные пути коррекции вторичных повреждений мозга. Новости науки и техн. Сер. Мед. Вып. Реаниматология. Интенсивная терапия. Анестезиология. ВИНИТИ, 1997; 2: 11-21.
7. Викторов И.В. Окраска нервной ткани забуференным раствором крезилового фиолетового прочного. Современные методы морфологических исследований мозга. Ин-т мозга АМН СССР. М. 1969: 7-11.
8. Викторов И.В. Ускоренный метод комбинированного окрашивания миелиновых волокон и клеток мозга. Арх. Пат., 1978; 40 (5): 73-75.
9. Викторов И.В. Современное состояние исследований регенерации центральной нервной системы in vitro и in vivo. Возбудимые клетки в культуре ткани. Пущино, 1984: 4-18.
10. Викторов И.В., Барсков И.В. Методика окрашивания ишемических

нейронов головного и спинного мозга. Патол. физиол. и эксперим. терапия., 1993; 2: 53.

11. Викторов И.В., Пашин С.С. Применение изопропилового спирта в гистологических методах: обезвоживание и заливка ткани в парафин, обработка парафиновых срезов. Бюлл. экспер. биол. мед., 2003,; 7: 119-120.

12. Волков С.Г., Верещагин Е.И. Модель экспериментальной травмы спинного мозга и эффективность нейропротекции кетамином в остром периоде спинно-мозговой травмы. Хирургия позвоночника. 2016; 13; 4: 90-93.

13. Воронина Т.А., Середенин СБ. Ноотропные препараты, достижения и новые проблемы. Эксперим. и клин. фармакология, 1998; 61; 4: 3-9.

14. Дупин А.М., Барсков И.В., Ерин А.Н., Викторов И.В. Уровень перекисного окисления липидов в очаге компрессионной ишемии коры головного мозга крыс. Бюл. Эксперим. биол. и мед., 1994; 118; 12: 589-590.

15. Кандель Э.И., Викторова Н.Д., Биезинь О.А. Основные данные о воздействии низких температур на биологические объекты. Криохирургия., Э.И. Кандель (ред.). М., Медицина., 1974: 37-71.

16. Козлов А.В. Изучение механизмов активации перекисного окисления липидов при патологических процессах. Роль эндогенного свободного железа. Дис. канд. биол. наук., М., ИХФ., 1985: 191.

17. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы. Руководство. М. Медицина., 1997: 119 - 122.

18. Лившиц А. В. Хирургия спинного мозга. М., 1990; 350.

19. Лилли Р.Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. (пер. под ред. Португалова В.В. Lillie R.D. Histopathologic technic and practical histochemistry). М. «Мир»., 1969: 645.

20. Лысенко А.В., Ускова Н.И.,Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А. Дипептидный ноотроп ГВС-111 предотвращает накопление продуктов перекисного окисления липидов при иммобилизации. Эксперим. и клин. фармакол., 1997; 60; 5: 15-18.

21. 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: 67.

22. 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: 39-40.

23. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А., Трофимов С.С., Бойко С.С., Жердев В.П., Середенин С.С. ГВС-111 - новый замещенный ацилпролил-дипептид с ноотропными свойствами. Лекарства -человеку., М., 1997; 4: 295-313.

24. Пашин С.С., Викторов И.В. Морфофункциональные изменения в спинном мозгу крыс после фокального фототромбоза. Морфология, Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, оригинальные исследования., 2008; 133 (1): 35-38. [Pashin S. S., Victorov I. V. Morphofunctional changes in the rat spinal cord after focal photothrombosis. Morphology, Archives of Anatomy, Histology, and Embryology., 2008; 133 (1): 35-38.]

25. 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 2019 г. Москва, 2019: 27-28.

26. Пашин С.С., Кузнецов С.Л., Пашина Н.Р., Цомартова Д.А., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю. Использование метода фокального фотоиндуцированного тромбоза при моделировании ишемии спинного мозга. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2019; 168 (10): 517-518.

27. Подачин В.П., Мусалов Г.Г., Незлина Н.И. Структурно-функциональные основы компенсации функций при травме спинного мозга. М., Наука, 1983: 190.

28. Ракитский В.Н., Пашин С.С. Нейропротекторное действие ноопепта на модели фокального ишемического повреждения спинного мозга.

Токсикологический вестник., 2016; 137 (2): 37-40. [Rakitskii V.N., Pashin S. S. Neuroprotective action of noopept in a model of focal ischemic damage to the spinal cord, caused by method of photoinduced thrombosis. Toxicological Review., 2016; 137 (2): 37-40.]

29. Реутов В. П. , Сорокина Е. Г., Охотин В. Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М., Наука., 1997: 156.

30. Романова Г.А., Гудашева Т.А., Добрынин В.П., Островская Р.У. Сравнительная характеристика влияния пептидных аналогов пирацетама на восстановление условнорефлекторной деятельности животных после повреждения фронтальной коры и электрофизиологические характеристики интегративной деятельности мозга. Эксперим. и клин. фармакол., 1992; 55; 5: 6-8.

31. Романова Г.А. ,Барсков И.В., Советов А.Н., Викторов И.В. Нарушения интегративной деятельности мозга крыс при двусторонней фокальной компрессионной ишемии лобной коры. Бюл. Эксперим. биол. и мед., 1994; 12: 568-571.

32. Романова Г.А., Барсков И.В., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Викторов И.В. Поведенческие и морфологические нарушения, вызванные двусторонним фотоиндуцированным тромбозом мозговых сосудов лобной коры мозга крыс. Патол. физиол. и эксперим. терапия., 1998; 2: 8-10.

33. Ромейс Б. Микроскопическая техника., М., 1953: 158.

34. Свищев А.В. К методике количественной оценке морфологических изменений в центральной нервной системе. Бюлл. экспер. биол. и мед. 1975; 12: 100.

35. Трушникова Т.Н., Медведева Е.Л., Байдина Т.В., Данилова М.А. Мозговой и цилиарный нейротрофические факторы у больных рассеянным склерозом. Ж. неврологии и психиатрии. 2014; 2: 33-36.

36. Федорова Т. Н., Болдырев А.А., Ганнушкина И.В. Перекисное окисление липидов при экспериментальной ишемии мозга. Биохимия, 1999; 64; 1: 94-98.

37. Чепкова А.Н., Трофимов С.С., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Смольникова Н. Повреждение пластических свойств синаптической передачи в гиппокампе крыс в результате пренатальной гипоксии и их нормализация при лечении ноотропными

дипептидами. Бюл. Эксперим. биол. и мед., 1995; 120; 12: 592-595.

38. Шеперд Г. Нейробиология. В двух томах (пер. под ред. Сахарова Д.А. Shepherd G.M. Neurobiology. Oxford University Press, 1983). М. «Мир», 1987; 1: 455.

39. Alluin O., Karimi-Abdolrezaee S., Delivet-Mongrain H., Leblond H., Fehlings M.G., Rossignol S. Kinematic study of locomotor recovery after spinal cord clip compression injury in rats. Neurotrauma. 2011; 28: 1963-1981.

40. Anderson AJ, Najbauer J, Huang W, Young W, Robert S. Upregulation of complement inhibitors in association with vulnerable cells following contusion-induced spinal cord injury. J Neurotrauma., 2005; 22 (3): 382-97.

41. Astrup J., Siesjő B.K., Symon L. Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. Stroke., 1981; 12 (6): 723-725.

42. Barskov I.V., Victorov I.V. Pressure induced local cortical infarction (PILCI). Description of methodology and morphological evaluation. Proc. of the 3rd Intern. Symp. on Exp. and Clin. Neurobiol. Stara Lesna. Czechoslovakia., 1991: 12-18.

43. Beattie, M.S., Farooqui, A.A., Bresnahan J.C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. J. Neurotrauma. 2000; 17: 915–925.

44. Beck T., Bielenberg G.W. The effects of two 21-aminosteroids on overt infarct size 48hours after middle cerebral artery occlusion in the rat. Brain Res.; 1991: 560 (1-2): 159-162.

45. Beckman J.S., Ye Y.Z., Chen J., Conger K.A. Cellular and molecular mechanisms of ischemic brain damage. Siesjo B.K., Wieloch T.(Eds.) Adv. Neurol., 1996; 71: 339-354.

46. Bunge M.V., Holets V.R., Bates M.L., Carke T.S., Watson B.D. Characterization of photochemically indused spinal cord injury in the rat by light and electron microscopy. Exp. Neurol., 1994; 127: 76-93.

47. Castillo J., Davalos A., Noya M. Progression of ishaemic stroke and excitotoxic aminoacids. Lancet., 1997; 349 (1): 79-83.

48. Chan P.H., Kinouchi H., Epstein C.J., Carlson E., Chen S.F., Imaizumi S., Yang G.Y. Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: reduction of edema andinfarction in transgenic mice following focal cerebral ischemia. Prog. Brain Res.,

1993; 96: 97-104.

49. Charriaut-Marlangue C, Margaill I., Represa A. Apoptopsis and necrosis after reversible focal ischemia. An in situ DNA fragmentation analysis. J. Cereb. Blood Flow Metab., 1996; 16: 186-194.

50. Chatzipanteli K., Garcia R., Marcillo A.E., Loor K.E., Kraydieh S., Dietrich W.D. Temporal and segmental distribution of constitutive and inducible nitric oxide synthases after traumatic spinal cord injury: effect of aminoguanidine treatment. J Neurotrauma, 2002; 19 (5): 639–651.

51. Chepkova A.N., Doreulee N.V., Trofimov S.S., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Skrebitsky V.G. Nootropic compound L-pyroglutamyl-D-alanine-amide restores hippocampal long-term potentiation impaired by exposure to ethanol in rats. Neurosci. Lett., 1995; 188 (3): 163-166.

52. Choi D.W., Rothman S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Annu. Rev. Neurosci., 1990; 13: 171-182.

53. Clifton G.L., Jiang J.Y., Lyeth B.G., Jenkins L.W., Hamm R.J., Hayes R.L. Marked protection by moderate hypothermia after experimental traumatic brain injury. J. Cered. Blood Flour Metab., 1991; 11 (1): 114-121.

54. Darcin O.T., Baktiroglu L., Ozkul Y., Ozardali I., Andac M.H. Prevention of postischemic spinal cord injury by means of regional infusion of adenosine and L-carnitine dissolved in normothermic saline. Ann. Vasc. Surg., 2004; 18 (3): 343-348.

55. Dawson T.M., Lavi E., Raps E.C., Goldberg H.I. Thrombotic microangiopathy isolated to the central nervous system. Ann. Neurol., 1991; 30 (6): 843-846.

56. Dawson T.M., Snyder S. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. J. Neurosci., 1994; 14: 5147- 5159.

57. Dawson V.L., Dawson T.M., Uhl G.R., Snyder S.H. Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993; 90 (8): 3256- 3259.

58. Dietrich W.D., Miller L.P., Prado R., Dewanjee S., Alexis N., Dewanjee M.K., Gruber H. Acadesin reduces indium-labeled platelet deposition after photothrombosis of the common carotid artery in rats. Stroke., 1995; 26 (1): 111-116.

59. Du C., Hu R., Csernansky C.A., Hsu C.Y., Choi W. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? J. Cereb. Blood Flow Metab., 1996; 16: 195-201.

60. Dulak J., Józkowicz A., Dembinska-Kiec A., Guevara I., Zdzienicka A., Zmudzinska-Grochot D., Florek I., Wójtowicz A., Szuba A., Cooke J.P. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000; 20 (3): 659–666.

61. Ege E., Ilhan A., Gurel A., Akyol O., Ozen S. Erdosteine ameliorates neurological outcome and oxidative stress due to ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 2004; 28 (4): 379-386.

62. Fan L., Wang K., Shi Z., Die J., Wang C., Dang X. Tatramethylpyrazine protects spinal cord and reduces inflammation in a rat model of spinal cord ischemia-reperfusion injury. J. Vase Surg., 2011; 54: 192-200.

63. Favaron M., Manev H., Alho H., Bertolino M., Ferret B., Guidotti A., Costa E. Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1988; 85 (19): 7351-7355.

64. Gajkowska B., Banievich-Frontchak M., Gadamski R., Barskov I. Photochemically-induced vascular damage in brain cortex. Transmission and scanning electron microscopy study. Acta Neurobiol. Exp., 1997; 57: 203-208.

65. Gouliaev A., Senning A. Piracetam and other structurally related nootropics. Brain Res. Rev., 1994; 19: 180-222.

66. Grammas P., Lin G., Wood K., Floyd R. Anoxia/reoxygenation induses high hydroxyl free radical formation in brain microvessels. Free Radical Biol. Med., 1993; 14: 553-557.

67. Gudasheva T.A., Boyko S.S., Ostrovskaya R.U., Voronina T.A., Akparov V.K., Trofimov S.S., Rozantsev G.G., Skoldinov A.P., Zherdev V.P., Seredenin S.B. The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and its similarity to endogenous neuropeptide cyclo-L- prolylglycine. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 1997; 22; 3: 245-252.

68. Hashimoto M., Sun D., Rittling S.R., Denhardt D.T., Young W. Osteopontin-

deficient mice exhibit less inflammation, greater tissue damage, and impaired locomotor recovery from spinal cord injury compared with wild-type controls. J Neurosci. 2007; 28; 27 (13): 3603-11.

69. Hayes R.L., Jenkins L.W., Lyeth B.G., Balster R.L., Robinson S.E., Clifton G.L., Stubbins J.F., Young H.F. Pretreatment with phencyclidine, an N-methyl-D-aspartate antagonist, attenuates long-term behavioral deficits in the rat produced by traumatic brain injury. J. Neurotrauma, 1988; 5 (4): 259-274.

70. Hewson D.W., Bedforth N.M., Harman J.G. Spinal cord injury arising in anaesthesia practice. Anaesthesia. 2018; 73 (1); 43-50.

71. Hicks R.R., Smith D.H., Gennarelli T.A., Mclntosh T. Kynurenate is neuroprotective following experimental brain injury in the rat. Brain Res., 1994; 655 (1-2): 91-96.

72. Huang Z., Huang P.L., Panahian N., Dalkara T., Fishman M.C., Moskowitz M.A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. Sciens., 1994; 265 (5180): 1883-1885.

73. Ilhan A., Yilmaz H.R., Armutcu F., Gurel A., Akyol O. The protective effect of nebivolol on ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry., 2004; 28 (7): 1153-60.

74. Imaizumi S., Woolworth V., Fishman R.A., Chan P.H. Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces cerebral infarction in cerebral ischemia in rats. Stroke., 1990; 21: 1312-1317.

75. Jacobs T.P., Shohami E., Baze W., Burgard E., Gunderson C., Hallenbeck J.M., Feuerstein G. Deteriorating stroke model: histopathology, edema, and eicosanoid changes following spinal cord ischemia in rabbits. Stroke., 1987; 18 (4): 741-750.

76. Johnson E. M., Deckwer T. L. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. Ann. Rev. Neurosci, 1993; 16: 31-46.

77. Jones N.M., Bergeron M. Hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain involves enhanced ERK 1/2 signaling. J. Neurochem. 2004; 89 (1): 157-167.

78. Kader A., Franzini V., Solomon R., Trifiletti R. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. Stroke, 1993; 24: 1709-1716.

79. Kharlamov A., Guidotti A., Costa E. et al. Semisynthetic sphingolipids prevent protein kinase C translocation and neuronal damage in the perifocal area following a photochemically induced thrombotic brain cortical lesion. J. Neurosci., 1993; 13 (6): 2483-2494.

80. Labat V., Tomasi S. Photothrombotic ischemia: A minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies. J. Vizualized Experiments., 2013; 76: 50370.

81. Lang-Lazdunski L., Heurteaux C., Dupont H., Rouelle D., Widmann C., Mantz J. The effects of FK506 on neurologic and histopathologic outcome after transient spinal cord ischemia induced by aortic cross-clamping in rats. Anesth. Analg., 2001; 92 (5): 1237-1244.

82. Lee Jin-Moo, Zipfel G. J., Choi D. W. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. Nature., 1999; 399 (24): A7-A14.

83. Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. J Neurotrauma, 2000; 17: 871–890.

84. Liu S., Schackel T., Weidner N., Puttagunta R. Biomaterial-supported cell transplantation treatments for spinal cord injury: challenges and perspectives. Front Cell Neurosci. 2017; 11: 430.

85. Lombardi G., Beni M., Consolazione A., Moroni F. Lesioningand recovery of the serotoninergic hippocampal afferents: differential effects of GM1 ganglioside. Neuropharmacology, 1988; 27 (11): 1085 -1088.

86. López-Vales R., García-Alías G., Forés J., Navarro X., Verdú E. Increased expression of cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor in lesioned spinal cord by transplanted olfactory ensheathing cells. J Neurotrauma 2004; 21: 1031–1043.

87. López-Vales R., García-Alías G., Forés J., Navarro X., Verdú E. Transplanted olfactory ensheathing cells modulate the inflammatory response in the injured spinal cord. Neuron Glia Biol., 2005; 1: 1–9.

88. Luer M.S., Rhoney D.H., Hughes M., Hatton J. New pharmacologic strategies for acute neuronal injury. Pharmacotherapy, 1996; 16 (5): 830-848.

89. Lyeth B.G., Jiang J.Y., Liu S. Behavioral protection by moderate hypothermia

initiated after experimental traumatic brain injury. J. Neurotrauma, 1993; 10 (1): 57-64.

90. Manev H., Kharlamov A., Armstrong D. Photochemical brain injury in rats triggers DNA fragmentation, p53 and HSP72. Neuroreport., 1994; 5: 2661-2664.

91. Maldonado T.S., Rockman C.B., Riles E., Douglas D., Adelman M.A., Jacobowitz G.R., Gagne P.J., Nalbandian M.N., Cayne N.S., Lamparello P.J., Salzberg S.S., Riles T.S. Ischemic complications after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. J. Vasc. Surg., 2004; 40 (4): 703-710.

92. Martin R.L. Experimental neuronal protection in cerebral ischaemia. Part I: Experimental models and pathophysiological responses. J. Clin. Neurosci., 1997; 4 (2): 96-113.

93. Martin R.L. Experimental neuronal protection in cerebral ischeaemia. Part II: Potential neuroprotective drugs. J. Clin. Neurosci, 1997; 4 (3): 290 - 306.

94. Marx J.L. Regeneration in the central nervous system. Science, 1980; 209 (4454): 378-380.

95. Mclntosh T.K., Faden A.I., Yamakami I., Vink R. Magnesium deficiency exacerbates and pretreatment imprjves outcome following traumatic brain injury in rats: 31P magnetic resonance spectroscopy andbehavioral studies. J. Neurotrauma, 1988; 5 (1): 17-31.

96. Mclntosh T.K., Smith D.H., Garde E. Therapeutic approaches for the prevention of secondary brain injury. Eur. J. Anaesthesiol., 1996; 13: 291-309.

97. Mohan P., Ard M. Induction of microglial nitric oxide sinthesis by very low density lipoprotein. Glia., 1996; 17; 3: 259-262.

98. Molina V.A., Keller E.A., Orsingher O.A. Gangliosides enhance behavioral and neurochemical effects induced by chronic desipramine (DMI) treatment. Eur. J. Pharmacol., 1989; 160 (2): 247-252.

99. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 1991; 43 (2): 109-142.

100. Morandi X, Riffaud L, Houedakor J, Amlashi SF, Brassier G, Gallien P. Caudal spinal cord ischemia after lumbar vertebral manipulation. Joint Bone Spine., 2004; 71 (4): 334-337.

101. Motoyoshi N., Sakurai M., Hayashi T., Aoki M., Abe K., Itoyama Y., Tabayashi K. Establishment of a local cooling model against spinal cord ischemia representing prolonged induction of heat shock protein. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 2001; 122 (2): 351-357.

102. Nedeltchev K, Loher TJ, Stepper F, Arnold M, Schroth G, Mattle HP, Sturzenegger M. Long-term outcome of acute spinal cord ischemia syndrome. Stroke., 2004; 35 (2): 560-565.

103. Okiyama K., Smith D.H., Thomas M.J., Mclntosh T.K. Evaluation of a novel calcium channel blocker, (S)-emopamil, on regional cerebral edema and neurobehavioral function after experimental brain injury. J. Neurosurg., 1992; 77 (4): 607-615.

104. Okiyama K., Rosenkrantz T.S., Smith D.H., Gennarelli T.A., Mclntosh T.K. (S)-emopamil attenuates acute reduction in regional cerebral blood flow following experimental brain injury. J. Neurotrauma, 1994; 11 (1): 83-95.

105. Olney J.W., Labruyere J., Price M.T. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. Science, 1989; 244 (4910): 1360-1362.

106. Orendacova J, Racekova E, Kucharova K, Pousova B, Ondrejcak T, Martoncikova M, Daxnerova Z, Marsala J. Ependyma as a possible morphological basis of ischemic preconditioning tolerance in rat spinal cord ischemia model: nestin and Fluoro-Jade B observations. Cell Mol. Neurobiol., 2004; 24 (3): 477-489.

107. Page S. J., Levine P., Strayer J. An electric stimulation cycling protocol for gait in incomplete spinal cord injury. Arch. Phys. Med. Rehadil., 2007; 88 (6): 798-800.

108. Panahian N., Yoshidea T., Huang P.L., Hedley-Whyte E.T., Dalkara T., Fishman M.C., Moskowitz M.A. Attenuated hippocampal damage after global cerebral ischemia in mice mutant in neuronal nitric oxide synthase. Neuroscience., 1996; 72: 343-354.

109. Panter S.S., Faden A.L. Pretreatment with the NMDA antagonists limits release of excitatory amino acids following traumatic brain injury. Neurosci. Lett., 1992; 136: 165-168.

110. Parsons C.G., Danysz W., Quack G. Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: An Update. Drug News Perspect., 1998; 11; 9: 523-568.

111. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur. J. Pharmacol., 1978; 47 (4): 379-391.
112. Rees S.L., Panesar S., Steiner M., Fleming A.S. The effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on maternal behavior in the postpartum rat. Horm. Behav., 2004; 46 (4): 411-419.
113. Romanova G.A., Mirzoev T.K., Barskov I.V., Victorov I.V., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U. Antiamnesic effect of acyl-prolyl-containing dipeptide (GVS-111) in compression-induced damage to frontal cortex. Bull. Exp. Biol. Med., 2000; 130 (9): 846-848.
114. Rosenblum W.I. Histopathologic clues to the pathways of neuronal death following Ischemia/hypoxia. J. Neurotrauma., 1997; 14; 5: 313-326.
115. Rosenzweig ES, McDonald JW. Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. Curr. Opin. Neurol., 2004; 17 (2): 121-31.
116. Saeki H., Matsumoto M., Kaneko S., Tsuruta S., Cui Y.J., Ohtake K., Ishida K., Sakabe T. Is intrathecal magnesium sulfate safe and protective against ischemic spinal cord injury in rabbits? Anesth. Analg., 2004; 99 (6): 1805-1812.
117. Seidman M.D., Quirk W.S., Nuttall A.L., Schweitzer V.G. The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase-polyethylene glycol on ischemic and reperfusion-induced cochlear damage. Otolaryngol. Head. Nec. Surg., 1991; 105 (3): 457-463.
118. Seren M.S., Rubini R., Lazzaro A., Zanoni R., Fiori M.G., Leon A. Protective effects of a monosialoganglioside derivative following transitory forebrain ischemia in rats. Stroke, 1990; 21 (11): 1607-1612.
119. Shanshan C., Minchun Y., Guozhong Z., Yuechang P., Yi H., Mihua H., Hua J. Abdominal aortic transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells regulates the expression of ciliary neurotrophic factor and inflammatory cytokines in a rat model of spinal cord ischemia-reperfusion injury. Mtdical science monitor. 2019; 25: 1960-1969.
120. Shi E., Kazui T., Jiang X., Washiyama N., Suzuki K., Yamashita K., Terada H. NS-7, a novel Na+/Ca2+ channel blocker, prevents neurologic injury after spinal cord

ischemia in rabbits. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2005; 129 (2): 364-371.

121. Siesjo B.K. Mechanisms of secondary brain damage in global focal ischaemia: a speculative synthesis. J. Neurotrauma., 1995; 12: 943-956.

122. Siesjo B.K. and Siesjo P. Mechanisms of secondary brain injury. Eur. J.Anaesthesiol., 1996; 13: 247-268.

123. Smith D.H., Okiyama K., Gennarelli T.A., Mclntosh T.L. Magnesium and ketamine attenuate cognitive dysfunction following experimental brain injury. Neurosci. Let., 1993; 157 (2): 211-214.

124. Solntseva E.I., Bukanova J., Ostrovskaya R.. et al. The effects of piracetam and its novel peptide analogue GVS-111 on neuronal voltage-gated calcium and potassium channels. Gen. Pharmacol., 1997; 29: 85-89.

125. Stein D.G., Halks-Miller M., Hoffman S.W. Intracerebral administration of alpha-tocopherol-containing liposomes facilitates behavioral recovery in rats with bilateral lesions of the frontal cortex. J. Neurotrauma, 1991; 8 (4): 281-292.

126. Strauch J.T., Lauten A., Spielvogel D., Rinke S., Zhang N., Weisz D., Bodian C.A., Griepp R.B. Mild hypothermia protects the spinal cord from ischemic injury in a chronic porcine model. Eur. J. Cardiothorac. Surg., 2004; 25 (5): 708-15.

127. Sweeney M.I., Yager J.Y., Walz W., Juurlink B. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. Can. J. Physiol. Pharmacol., 1995; 73: 1525-1535.

128. Taft W.C., Yang K., Dixon C.E., Clifton G.L., Hayes R.L. Hypothermia attenuates the loss of hippocampal microtubule-associated protein 2 (MAP 2) following traumatic brain injury. J. Cereb. Blood Flow Metab., 1993; 13 (5): 796-802.

129. Takahashi M., Macdonald R. L. Vascular aspects of neuroprotection. Neurol. Res., 2004; 26 (8): 862-869.

130. Takahashi K., Iijima K., Oguro H., Bokura H., Nagai A., Yamaguchi S., Kobayashi S. Intravenous tissue plasminogen activator (t-PA) for acute ischemic stroke in a local university hospital. No To Shinkei., 2005; 57 (8): 683-688.

131. Takeo S., Hayashi H., Miyake K., Takagi K., Tadokoro M., Takagi N., Oshikawa S. Effects of delayed treatment with nebracetam on neurotransmitters in brain regions after microsphere embolism in rats. British J. Pharmacol., 1997; 121: 477-484.

132. Truelove D., Shuaib A., Ijaz S., Richardson S., Kalra J. Superoxide dismutase, catalase, and U78517F attenuate neuronal damage in gerbils with repeated brief ischemic insults. Neurochem. Res., 1994; 19 (6): 665-671.

133. Tsutsumi K., Ueda T., Shimizu H., Hashizume K., Yozu R. Effect of delayed induction of postischemic hypothermia on spinal cord damage induced by transient ischemic insult in rabbits. Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 2004; 52 (9): 411-418.

134. Van Reempts J., Borgers M. Histopathlogical characterization of photochemical damage in nervous tissue. Histol. Histopath, 1994; 9: 185-195.

135. Verdú E., García-Alías G., Forés J., López-Vales R., Navarro X. Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. Glia, 2003; 42: 275–286.

136. Victorov I.V., Prass K., Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. Brain Res. Protocols., 2000; 5: 135-139.

137. Voronina T.A., Garibova T.L., Trofimov S.S., Sopyev Zh.A., Petkov V.D., Lazarova M.B. Comparative studies on the influence of ONK (N(5-hydroxynicotinoil) glutamic acid), piracetam and meclofenoxate on the learning- and memory-impairing effect of scopolamine, clonidine, and methergoline. Acta. Physiol. Pharmacol. Bulg., 1991; 17 (4): 8-16.

138. Wahlgren C.M., Wahlberg E. Management of Thoracoabdominal Aneurysm Type IV. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 2005; 2: 116-23.

139. Walsh T.J., Emerich D.F., Schmechel D.E. GM1 ganglioside attenuates the behavioral deficits but not the granule cell damage produced by intradentate colchicines. Brain Res., 1989; 478 (1): 24-33.

140. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. Ann. Neurol. 1985; 17: 497-504.

141. Watson, B.D., Holets, V.R., Prado, R., et al. Laser-driven photochemical induction of spinal cord injury in the rat: methodology, histopathology and applications. Neuroprotocols. 1993; 3: 3–15.

142. Windle W. F. Recollections of research in spinal cord regeneration. Exp. Neurol., 1981; 71 (1): 1-5.
143. Yamamoto M., Shima T., Uozumi T., Sogabe T., Yamada K., Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration. Stroke., 1983; 14 (6): 977-982.
144. Yamauchi H., Kudoh T., Kishibe Y., Iwasaki J., Kagawa S. Selective neuronal damage and borderzone infarction in carotid artery occlusive disease: a 11C-flumazenil PET study. J. Nucl. Med., 2005; 46 (12): 1973-1979.
145. Yamauchi H., Kudoh T., Kishibe Y., Iwasaki J., Kagawa S. Selective neuronal damage and chronic hemodynamic cerebral ischemia. Ann Neurol., 2007; 61 (5): 454-465.
146. Yang C.S., Lin N.N., Tsai P.J., Liu L., Kuo J.S. In vivo evidens of hydroxyl radical formation induced by elevation of extracellular glutamate after cerebral ischaemia in the cortex of anesthetized rats. Free Radical Biol. Med., 1996; 20: 245-250.
147. Yeo S.J., Hwang S.N., Park S.W. Kim Y.B., Min B.K., Kwon J.T., Suk J.S. Development of a rat model of graded contusive spinal cord injury using a pneumatic impact device. J. Korean Med. Sci., 2004; 19: 574-580.
148. Young W. F. Spinal cord contusion models. Prog. Brain Res., 2002; 137: 231-255.
149. Yuan X.Q., Smith T.L., Prough D.S., De Witt D.S., Dusseau J.W., Lynch C.D., Fulton J.M., Hutchins P.M. Long-term effects of nimodipine on pial microvasculature and systemic circulation in conscious rats. Am. J. Physiol., 1990; 258 (5 pt 2): H1395-1401.
150. Zipfel G.J., Lee Jin-Moo, Choi D.W. Reducing calcium overload in the ischemic brain. N. Engl. J. Med., 1999; 341: 1543-1544.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаю благодарность сотрудникам медицинского института федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации» (Сеченовский Университет)

Методическую помощь в работе над материалами диссертации

Начальник отдела Аспирантуры и докторантуры

Доцент, доктор медицинских наук

Заброда Надежда николаевна

Документовед отдела Аспирантуры и докторантуры по работе с лицами, прикрепленными для подготовки диссертаций

Пискунова Елена Владимировна

Документовед отдела Аспирантуры и докторантуры

Кузьмина Ирина Александровна

Ученый секретарь диссертационного совета, д.м.н., доцент

Блинова Екатерина Валериевна

Обсуждение работы и конструктивные замечания:

Заведующий кафедрой д.м.н., член-корр. РАН **Кузнецов Сергей Львович**

д.м.н., профессор **Яцковский Александр Никодимович**

д.м.н., профессор **Боронихина Татьяна Владимировна**

д.б.н., профессор **Мухамедова Светлана Галиевна**

д.б.н., старший преподаватель **Паюшина Ольга Викторовна**

к.м.н., доцент **Цомартова Дибахан Асланбековна**

к.м.н., доцент **Черешнева Елизавета Васильевна**

к.м.н., доцент **Иванова Марина Юрьевна**

к.м.н., доцент **Пашина Наталия Рудольфовна**