

На правах рукописи

Кузьмин Андрей Николаевич

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ АСПЕКТЫ КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ
ЭРИТРОПОЭТИНА И ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ИШЕМИИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

14.03.03 – Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Осиков Михаил Владимирович

доктор медицинских наук, профессор

Гиниатуллин Равиль Усманович

Официальные оппоненты:

Шевелев Олег Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», Институт реабилитологии, лаборатория клинической нейрофизиологии, главный научный сотрудник

Сумная Дина Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Уральский государственный университет физической культуры» Министерства спорта Российской Федерации, кафедра биохимии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.08 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертационного исследования

В Российской Федерации, как и в большинстве стран мира, показатели заболеваемости и смертности от инсульта среди лиц трудоспособного возраста занимают второе место. При этом преобладают ишемические инсульты, составляющие до 80% от общего числа острых нарушений мозгового кровообращения (Доклад ВОЗ, 2015; Пирадов М. А., 2015; Guzik A., 2017; Narayanaswamy V., 2017; Venketasubramanian N., 2017).

Патогенез повреждений нервной ткани при ишемическом инсульте является многофакторным, на феноменологическом уровне накоплено большое количество сведений о роли различных факторов: повреждение митохондрий, нарушение энергообеспечения и внутриклеточный ацидоз, эскалация оксидативного стресса, дисфункция ионных каналов, дисбаланс ионов и воды, глутаматная эксайтотоксичность и активация глутамат-кальциевого каскада, дисфункция нейтроглии и др. (Abeysinghe H. C., 2016; Arbo B. D., 2016; Beretta S., 2015; Heiss W. D., 2012; Hossmann K. A., 2012; Olney J. W., 2017).

В ограничении зоны вторичной альтерации (пенумбры), дисфункции и гибели нейронов в «ядре» очага повреждения как во время ишемии, так и в момент реперфузии основное значение имеют неоангиогенез, регулируемый факторами роста, в том числе вазоэндотелиальным (VEGF), увеличение кислородной емкости крови, восстановление баланса процессов свободнорадикального окисления. В этой связи патогенетическое обоснование и применение новых методов первичной и вторичной нейропротекции в экспериментальных условиях *in vivo* является актуальной и востребованной задачей патофизиологии и неврологии (Rewell S. S., 2017; Tajiri N., 2013).

Степень разработанности темы диссертационного исследования

Нейропротективные подходы в настоящее время занимают ключевую позицию в терапии ишемических поражений ЦНС (Бельская Г. Н., 2016, 2017; Lapchak P. A., 2013; Patel Rajan A. G., 2017). Особого внимания, по данным многих авторов, заслуживает комбинация различных методов нейропротекции.

Эритропоэтин (ЭПО) в настоящее время рассматривается не только как фактор регуляции эритропоэза. Обнаружение рецепторов для ЭПО на эндотелиоцитах, нефроцитах, нейронах, глиоцитах, лимфоцитах, моноцитах, эпителиоцитах, кардиомиоцитах и др. клетках позволяет говорить о плеiotропных эффектах данного гликопротеина (Arcasoy M. O., 2008; Miljus N., 2017; Zhang X., 2015). ЭПО участвует в эмбриогенезе ЦНС, препятствует атрофии нервной ткани при экспериментальных черепно-мозговых травмах, энцефаломиелите аутоиммунного генеза, оказывает влияние на аффективный и психофизиологический статус,

состояние вегетативной нервной системы (Осиков М. В., 2010, 2013, 2014, 2016, 2019; Blixt J., 2018; McPherson R. J., 2010; Ostrowski D., 2018).

Известно, что воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением на ткани стимулирует пролиферативную активность клеток, снижает выраженность апоптоза и некроза в культурах клеток, усиливает микроциркуляцию и неоангиогенез, активирует метаболизм клеток и утилизацию кислорода в поврежденных тканях (Головнева Е. С., 2009; Dzierko M., 2013; Guo H., 2016; Hamblin M.R., 2018). Указанные сведения предполагают нейропротекторный эффект ЭПО и лазерного излучения (ЛИ) при ишемических поражениях головного мозга (ГМ) и явились предпосылкой для проведения настоящего исследования.

Цель исследования

Исследовать некоторые механизмы нейропротекторного влияния комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.

Задачи исследования

1. Исследовать морфологию, микроциркуляцию, экспрессию VEGF в очаге повреждения, неврологический и этологический статус, количественный состав клеток и концентрацию эритропоэтина в крови в динамике экспериментальной ишемии коры головного мозга.

2. Изучить влияние эритропоэтина на неврологический и этологический статус, морфологию, микроциркуляцию, экспрессию VEGF в очаге повреждения, количественный состав клеток крови в динамике экспериментальной ишемии коры головного мозга.

3. Изучить влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на неврологический и этологический статус, морфологию, микроциркуляцию, экспрессию VEGF в очаге повреждения, количественный состав клеток крови в динамике экспериментальной ишемии коры головного мозга.

4. Оценить влияние комбинированного применения эритропоэтина и низкоинтенсивного лазерного излучения на неврологический и этологический статус, морфологию, микроциркуляцию, экспрессию VEGF в очаге повреждения, количественный состав клеток крови в динамике экспериментальной ишемии коры головного мозга.

Научная новизна исследования

Впервые проведена комплексная оценка изменений неврологического статуса, этологического статуса, микроциркуляции, морфологии очага повреждения с экспрессией VEGF и гематологических показателей при экспериментальной ишемии коры головного мозга, индуцированной диатермокоагуляцией пиальных сосудов. Продемонстрировано, что в динамике экспериментальной ишемии коры головного мозга фиксируется очаговый неврологический дефицит, прогрессирующий по мере снижения в крови количества

эритроцитов, концентрации гемоглобина, повышения количества лейкоцитов, нейтрофилов, угнетается ориентировочно-исследовательская активность животных. В очаге повреждения прогрессивно снижается количество интактных нейронов, мелких сосудов, увеличивается количество нейронов с хроматолизом, клеток-теней, площадь инфаркта, увеличение количества мелких кровеносных сосудов ассоциировано с повышением экспрессии VEGF. Впервые показано, что комбинированное применение эритропоэтина и лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга приводит в динамике наблюдения к восстановлению неврологического и этологического статуса за счет улучшения микроциркуляции, повышения экспрессии VEGF, количества мелких кровеносных сосудов в очаге повреждения, восстановления количества интактных нейронов и сокращения площади инфаркта, уменьшения количества нейронов с хроматолизом, клеток-теней, снижения количества лейкоцитов и увеличения количества эритроцитов, концентрации гемоглобина в крови. Особенностью нейропротекторного действия эритропоэтина выступает увеличение количества эритроцитов, концентрации гемоглобина в крови, а лазерного излучения – повышение экспрессии VEGF в очаге повреждения. Нейропротекторный эффект эритропоэтина и лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга максимально выражен при комбинированном применении. По результатам исследования получен патент «Способ лечения ишемии головного мозга в эксперименте» (Пат. РФ на изобретение № 2495688 от 20.10.2013 г.).

Теоретическая и практическая значимость исследования

В ходе проведенного исследования в экспериментальных условиях уточнены закономерности изменений неврологического и этологического статуса при экспериментальной ишемии коры головного мозга (ИКГМ), индуцированной диатермокоагуляцией пиальных сосудов, а именно продемонстрирована роль изменений микроциркуляции, морфологии очага ишемического повреждения и экспрессии в нем VEGF, количественного состава лейкоцитов и эритроцитарных индексов. Установлена нейропротекторная роль комбинированного применения ЭПО и ЛИ при экспериментальной ИКГМ, опосредованная восстановлением микроциркуляции, повышением экспрессии VEGF, количества мелких кровеносных сосудов в очаге повреждения, увеличением количества интактных нейронов и уменьшением площади инфаркта, количества нейронов с хроматолизом, клеток-теней, снижением количества лейкоцитов и увеличением количества эритроцитов, концентрации гемоглобина в крови. Полученные результаты расширяют современные представления о механизме изменения гомеостаза при ишемических поражениях ЦНС, уточняют механизм и особенности нейропротекторного действия ЭПО и ЛИ, являются предпосылкой для проведения дальнейших

исследований по изучению эффективности применения ЭПО и ЛИ при цереброваскулярной патологии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В динамике экспериментальной ишемии коры головного мозга наблюдаются морфологические, клинические, инструментальные признаки фокальной ишемии, повышение экспрессии в очаге VEGF, ассоциированного с количеством мелких сосудов, увеличение количества нейтрофилов, снижение количества эритроцитов, концентрации гемоглобина в крови, ассоциированных с показателями неврологического и этологического статуса.
2. Применение эритропоэтина при экспериментальной ишемии коры головного мозга восстанавливает неврологический и этологический статус, микроциркуляцию в очаге на 14 сутки, снижает площадь инфаркта, количество поврежденных нейронов без изменения экспрессии VEGF во все сроки; увеличивает в крови количество эритроцитов, концентрацию гемоглобина, снижает количество лейкоцитов.
3. Лазерная терапия при экспериментальной ишемии коры головного мозга приводит к более позднему по сравнению с эритропоэтином восстановлению неврологического и этологического статуса, количества лейкоцитов в крови, морфологии очага повреждения, но повышению в нем во все сроки наблюдения экспрессии VEGF, ассоциированного с количеством кровеносных сосудов.
4. Комбинированное применение эритропоэтина и лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга приводит к восстановлению неврологического и этологического статуса, микроциркуляции в очаге с 14 суток, более раннему по сравнению с монотерапией эритропоэтином или лазерным излучением восстановлению количества эритроцитов, лейкоцитов в крови, морфологии очага повреждения, увеличению количества глиоцитов и экспрессии VEGF.

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы была спланирована в соответствии с целью и задачами исследования. Организация исследования одобрена этическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 4 от 21.04.2017).

Экспериментальные исследования выполнены на 200 белых нелинейных крысах массой 220 ± 20 г. в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург), Рекомендациями Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 года,

Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Методы исследования включали: экспериментальное моделирование, оценку неврологического статуса по шкале Garcia J. H., этологического статуса в актографе «открытое поле», доплеровской флоуметрии для оценки микроциркуляции в очаге ишемии, гематологические, иммуноферментного анализа, морфологические и иммуногистохимические, статистические.

Дизайн работы представлен в таблице 1.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе экспериментальных наблюдений, полноте и широте литературно-библиографической справки, использовании современных методов статистической обработки материалов исследования с применением пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 19.

Основные положения диссертации представлены на научно-практических конференциях патологоанатомов Южного Урала «Актуальные вопросы патологоанатомической практики» (Челябинск, 2014, 2015), на 10-й конференции хирургов Челябинской области «Актуальные вопросы хирургии» (Челябинск, 2014), на научно-практической конференции «Лазерные технологии в медицине» (Москва, 2014), на II Международной научно-практической конференции «Нейрореабилитация в нейрохирургии» (Казань, 2014), на XIV Научно-практической конференции «Поленовские чтения» (Санкт-Петербург, 2015), на VII Всероссийском съезде нейрохирургов (Казань, 2015), на Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы неврологии» (Челябинск, 2015), на VIII Международной (XV итоговой) научно-практической конференции молодых ученых ЮУГМУ (Челябинск, 2018).

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, постановку цели и задач, разработку дизайна исследования проводились совместно с научными руководителями. Выбор и обоснование методов и экспериментальной модели, набор, анализ и интерпретация экспериментального материала, поиск, анализ и обобщение данных отечественной и зарубежной научной литературы, статистическая обработка данных, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях, написание и оформление рукописи выполнены лично автором. Клинические, инструментальные, морфологические, иммуногистохимические,

гематологические исследования выполнены автором лично и при участии научных сотрудников НИИ иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Многопрофильный центр лазерной медицины» Министерства здравоохранения Челябинской области.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры Патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России и кафедры Нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, научную работу кафедры Патологической физиологии, НОЦ «Проблемы фундаментальной медицины» ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава Челябинской области.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.03.03 – Патологическая физиология, а именно пунктам 2, 6, 8, 9, 10 области исследования, указанной в паспорте данной специальности.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 22 научные работы, в том числе 8 работ в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ (из них 2 на электронном ресурсе), 1 работа в издании, индексируемом в международной базе данных Web of Science, 14 – в материалах конференций. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей материалы и методы исследования, изложения результатов собственного исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Библиографический указатель включает 308 отечественных и зарубежных источников литературы. Работа содержит 30 таблиц и 9 рисунков (включая 1 схему).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на кафедре Патологической физиологии, на базе Научно-исследовательского института иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный

медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Многопрофильный центр лазерной медицины» Министерства здравоохранения Челябинской области.

Моделирование ишемии коры головного мозга. ИКГМ у крыс создавали под наркозом («Золетил», МНН: тилетамина гидрохлорид, золазепам гидрохлорид, Франция) по методике, описанной Chen S. T. (Chen S. T., 1986), путем диатермокоагуляции пиальных сосудов коры головного мозга (ГМ) по периметру трепанационного отверстия в области задних отделов левой лобной доли и передних отделов левой теменной доли (прецентральные и постцентральные извилины левого полушария ГМ). ИКГМ верифицировали морфологическими методами. Животные были случайным образом разделены на 5 групп: группа 1 (n=40) – ложнооперированные; группа 2 (n=40) – животные с ИКГМ; группа 3 (n=40) – животные с ИКГМ, которым через 3, 24, 48 часов после индукции ИКГМ внутрибрюшинно вводили ЭПО в составе препарата «Эпокрин» (МНН: эпоэтин альфа, ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА, Россия) в разовой дозе 5 000 МЕ/кг; группа 4 (n=40) – животные, которым через 2 часа после индукции ИКГМ однократно воздействовали на область ишемического очага лазерным излучением с длиной волны 970 нм аппаратом «ИРЭ-Полюс» (ООО НТО «ИРЭ-Полюс», Россия); группа 5 (n=40) – животные с ИКГМ, которым через 2 часа после индукции ИКГМ проводили дистанционное накожное облучение лазером, как в группе 4, а через 3, 24 и 48 часов вводили ЭПО, как в группе 3. Исследования проводили на 3, 7, 14, 30 сутки после индукции ИКГМ.

Таблица 1

Дизайн исследования

Группы животных	Схема введения ЭПО	Параметры ЛИ	Сутки исследования	Кол-во крыс	Методы исследования
1. Ложнооперированные	Препарат не вводился	Облучение не проводилось	3, 7, 14, 30	40	Неврологические, этологические, доплер-флоуметрия, гематологические, морфологические, иммуногистохимические, ИФА, статистические
2. ИКГМ	Препарат не вводился	Облучение не проводилось	3, 7, 14, 30	40	
3. ИКГМ + ЭПО	5 000 МЕ/кг через 3, 24, 48 часов в/брюшинно	Облучение не проводилось	3, 7, 14, 30	40	
4. ИКГМ + ЛИ	Препарат не вводился	«ИРЭ-Полюс», 970 нм, 1 Вт, 2 мин, непр., дистанционно	3, 7, 14, 30	40	
5. ИКГМ + ЭПО + ЛИ	5 000 МЕ/кг через 3, 24, 48 часов в/брюшинно	«ИРЭ-Полюс», 970 нм, 1 Вт, 2 мин, непр., дистанционно	3, 7, 14, 30	40	

Забор крови осуществляли под наркозом после вскрытия грудной клетки пункцией сердца в области левого желудочка. Исследование морфологии очага ишемии проводили через 3, 7, 14, 30 суток после моделирования ишемии.

Оценка неврологического статуса по шкале Garcia J. H. Данный тест позволяет оценивать параметры, характеризующие поведенческую активность животных, двигательную, чувствительную, стато-координаторную функцию: спонтанная активность, симметричность в движении всех конечностей, симметричность в движениях передних конечностей при движении вперед, способность забираться по стенке клетки, оценка проприоцептивной чувствительности, ответ на прикосновение к вибриссам. Для интегральной оценки подсчитывали сумму баллов оцениваемых параметров: минимальное количество баллов (3 балла) – выраженный неврологический дефицит, максимальное (18 баллов) – отсутствие неврологического дефицита.

Этологические методы исследования. Животным всех групп проведено исследование этологического статуса с использованием актографа «открытое поле». Регистрировали горизонтальную активность, вертикальную активность, исследовательскую активность, число актов груминга, количество фекальных болюсов.

Оценка микроциркуляции в очаге ИКГМ методом доплеровской флоуметрии. Проводили с использованием прибора ЛАКК-01 (Россия) на основе инфракрасного лазера с помощью трехканального светового зонда, смонтированного из кварцевых моноволоконных световодов. Время записи флоуграммы 5 мин. С помощью комплекта программ ООО «Лазма» (Россия) определяли показатель микроциркуляции в перфузионных единицах (пф. ед.).

Гематологические методы исследования. На автоматическом гематологическом анализаторе для ветеринарии BC-2800 Vet (Mindray, Китай), откалиброванном для крови крыс, определяли количество лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов, эритроцитов, концентрацию гемоглобина, гематокрит, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците, количество тромбоцитов.

Методы иммуноферментного анализа использовали для определения концентрации эритропоэтина в сыворотке крови с помощью автоматического иммуноферментного анализатора Personal LAB (Италия) с применением специфической тест-системы для крыс фирмы Cloud-Clone Corp (США).

Морфологические и иммуногистохимические методы. После выведения животных из эксперимента ГМ извлекали и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина.

Серийные срезы ГМ окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Бильшовского, по методу Шпильмейера для выявления миелиновых волокон, по методу Ниссля для определения тигроидного вещества Ниссля, глиальных клеток. Подсчитывали на микроскопе Leica DMRXA (Германия) на 1 мм² среза количество нейронов (интактных, с хроматолизом, клеток-теней), глиоцитов и мелких кровеносных сосудов, а также площадь ишемического очага (в мкм²) при увеличении x400 и x200 соответственно. Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерной программы анализа изображений Image Scope M (Россия). Оценку экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в ткани ГМ проводили иммуногистохимическим методом с использованием набора первичных специфических для крыс антител к VEGF (клон SP 28, тип Rabbit, SpringBio).

Статистические методы исследования. Результаты обрабатывали с использованием программ IBM SPSS Statistics 19. Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей [Q₁-Q₃]. Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Крускала–Уолиса, Манна–Уитни. Анализ динамики изученных показателей в процессе лечения осуществляли с помощью критерия Фридмана и парного критерия Вилкоксона. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфофункциональные изменения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

В динамике экспериментальной ИКГМ (3, 7, 14, 30 сутки наблюдения) в очаге повреждения наблюдаются морфологические признаки глубокой церебральной ишемии – дистрофия и некроз нейронов и нейроглии, образование клеток-теней и амёбовидных астроцитов, фрагментация и распад миелиновых волокон, формирование глиосоединительнотканного рубца. Морфометрический анализ области ишемического повреждения ГМ позволил установить, что от 3 к 30 суткам эксперимента наблюдается снижение количества интактных нейронов, увеличение количества мелких сосудов, количества нейронов с хроматолизом, клеток-теней, площади инфаркта. При иммуногистохимическом исследовании очага ишемического повреждения выявлено повышение экспрессии VEGF во все сроки наблюдения. Корреляционный анализ установил, что в динамике экспериментальной ИКГМ количество мелких сосудов в очаге ишемического повреждения нарастает по мере повышения экспрессии VEGF. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей по изучению морфологии очага церебральной ишемии в экспериментальных условиях на животных и в клинических условиях у людей. Клиническим эквивалентом

обнаруженных морфологических изменений в ГМ при экспериментальной ИКГМ на всех сроках наблюдения является обнаружение у крыс очагового неврологического дефицита в виде двигательных, чувствительных и стато-координаторных расстройств, угнетения ориентировочно-исследовательской активности животных.

С использованием метода лазерной доплеровской флоуметрии установлено снижение микроциркуляции в очаге ИКГМ, показатель частично восстанавливается к 30 суткам эксперимента. Таким образом, облитерация пияльных сосудов и снижение кровотока в коре ГМ позволили моделировать морфологические и клинические признаки фокальной ишемии.

Наличие в ЦНС очага ишемического повреждения приводит к системным гематологическим эффектам. Так, по показателям лейкона при экспериментальной ИКГМ у крыс на 3, 7, 14 сутки наблюдается лейкоцитоз за счет увеличения в крови количества нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов. Полагаем, что полученные изменения обусловлены синтезом медиаторов воспаления в очаге повреждения, которые стимулируют миелоидный и лимфоидный ростки костного мозга и вносят вклад в эскалацию деструктивных процессов за счет нейтрофильной инфильтрации, расширения зоны пенумбры и обеспечивают репаративные процессы с участием лимфоцитов и моноцитов. По всей видимости, цитокинемия провоспалительных факторов (ИЛ-1 β , ФНО-альфа и др.) ограничивает синтез ЭПО в почках, что приводит к снижению концентрации ЭПО в крови. Последний факт был зафиксирован на 3 сутки экспериментальной ИКГМ.

Одним из последствий гипозэритропоэтинемии при ИКГМ, а также, по данным литературы, за счет нарушения метаболизма железа, активации гемолиза и др. факторов развиваются признаки анемии. Так, на 3 и 7 сутки экспериментальной ИКГМ в крови снижается количество эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, на 7 сутки снижается среднее содержание гемоглобина в эритроците и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах.

В определенной мере вклад указанных системных гематологических изменений в патогенез проявлений при инсульте подтверждается данными корреляционного анализа. Нами установлена ассоциация между показателем неврологического статуса по шкале Garcia J. H. и количеством эритроцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, концентрацией гемоглобина в крови.

Нейропротекторные аспекты применения эритропоэтина при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Системное применение ЭПО в суммарной дозе 15 000 МЕ/кг массы при экспериментальной ИКГМ приводит к изменению клинической картины – чувствительности, двигательной активности, стато-координаторной способности и ориентировочно-исследовательского поведения. Интегральный показатель неврологического статуса,

оцениваемый по шкале Garcia J. H., восстанавливается частично на 3 и 7 сутки, полностью – к 14 суткам наблюдения. В тесте «открытое поле» ориентировочно-исследовательское поведение крыс восстанавливается частично на 3, 7 и 14 сутки, полностью – к 30 суткам эксперимента.

Нейропротекторные эффекты ЭПО реализуются в том числе и через улучшение микроциркуляции очага ишемического повреждения. В условиях применения ЭПО показатель микроциркуляции в очаге ишемии полностью восстанавливается на 14 и 30 сутки наблюдения. Клинико-инструментальные изменения нашли отражение в морфологической картине очага ишемии при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО. Установлено, что в очаге ишемического повреждения на 3, 7, 14, 30 сутки наблюдения увеличивается представительство интактных нейронов и мелких кровеносных сосудов, снижается количество нейронов с хроматолизом и количество клеток-теней, снижается площадь инфаркта. Однако экспрессия VEGF в очаге ишемии не изменяется, что позволяет предположить активацию неоангиогенеза за счет других механизмов, прежде всего, собственного пролиферативного эффекта ЭПО в отношении ангиобластов.

Уменьшение площади очага повреждения, количества поврежденных и погибших нейронов, увеличение кровоснабжения приводят к меньшей выраженности системных гематологических проявлений при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО – количества лейкоцитов, количества эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови. Выявлено увеличение количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита на 7, 14, 30 сутки эксперимента, снижение среднего эритроцитарного объема на 7 и 14 сутки, снижение среднего содержания гемоглобина в одном эритроците на 14 сутки эксперимента. Максимальная выраженность эритропозитического эффекта ЭПО наблюдается на 7 сутки эксперимента. Кроме этого, в условиях применения ЭПО снижается количество нейтрофилов в крови во все сроки наблюдения, общее количество лейкоцитов и количество лимфоцитов в крови снижается на 7 и 14 сутки эксперимента, что позволяет говорить о частичном восстановлении представительства лейкоцитов в крови на 3, 7 и 14 сутки и о полном восстановлении – на 30 сутки.

Полагаем, что нейропротекторный эффект ЭПО при ИКГМ является многофакторным и реализуется за счет эритропозитического действия, прямого нейропротекторного действия, стимуляции неоангиогенеза, антиоксидантного и противовоспалительного эффектов (Agnello D., 2002; Bailey D. M., 2006; Kaiafa G., 2016; Komnig D., 2018; Kumral A., 2006; Milano M., 2005; Wang Y. J., 2011; Zhang L., 2017).

Нейропротекторные аспекты применения лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

В условиях применения ЛИ при экспериментальной ИКГМ интегральный показатель неврологического статуса повышается на 3 сутки и восстанавливается только к 30 суткам

наблюдения; максимальный эффект на ориентировочно-исследовательское поведение зафиксирован на 14 и 30 сутки, вертикальная активность восстанавливается с 7 суток, исследовательская активность – на 30 сутки.

При экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЛИ в очаге повреждения во все сроки наблюдения увеличивается количество интактных нейронов, экспрессия VEGF, снижается количество нейронов с хроматолизом и клеток-теней; на 7, 14 и 30 сутки увеличивается количество мелких кровеносных сосудов и сокращается площадь инфаркта. Максимальная выраженность эффектов ЛИ наблюдается на 30 сутки. По данным корреляционного анализа, количество мелких кровеносных сосудов в очаге повреждения нарастает по мере увеличения экспрессии VEGF. Итак, нейропротекция в условиях применения ЛИ фиксируется в очаге ишемии ГМ на более поздних этапах по сравнению с применением ЭПО.

В условиях применения ЛИ при ИКГМ на 7 и 14 сутки снижается в крови общее количество лейкоцитов за счет лимфоцитов, частично восстанавливается общее представительство лейкоцитов и лимфоцитов. Количество эритроцитов и другие показатели эритроцитоза не изменяются, сохраняются признаки анемии.

По результатам собственного исследования, а также по данным литературы, механизм нейропротекторного действия ЛИ при ишемических поражениях ЦНС может быть представлен несколькими компонентами: стимуляцией неоангиогенеза в нервной ткани за счет повышения экспрессии VEGF, активацией метаболизма и предотвращением гибели нейронов и астроглии в очаге повреждения, активацией функции митохондрий и утилизации кислорода в нейронах (Головнева Е. С., 2014; Москвин С. В., 2015; Dzielko M., 2013; Guo H., 2016; Hamblin M. R., 2018; Jittiwat J., 2017; Moreira M. S., 2011).

Нейропротекторные аспекты комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

При экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ во все сроки наблюдения увеличивается, а с 14 суток наблюдения полностью восстанавливается интегральный показатель неврологического статуса; на 3, 7, 14 сутки частично, а на 30 сутки полностью восстанавливается ориентировочно-исследовательское поведение животных. Показатель микроциркуляции в очаге ишемического повреждения увеличивается во все сроки наблюдения и полностью восстанавливается на 14 и 30 сутки эксперимента (таблица 2). Итак, неврологический статус и микроциркуляция в очаге ишемии восстанавливаются в те же сроки, что и в условиях монотерапии ЭПО, но не ЛИ.

Таблица 2

Морфофункциональные изменения при экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения (Ме [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО+ ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО+ ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО+ ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО+Л И (n=10)
НС, баллов	6 [5,00-7,25]	13 [11,50-14,00] *	9 [8,00-10,5]	15 [13,75-16] *	12 [11,0-13,0]	16,5 [15,0-17,0] *	17,5 [16,75-18,0]	15 [14,0-16,25] *
ГА, актов	7,0 [6,0; 8,0]	14,0 [12,5; 15,0] *	12,0 [11,5; 12,75]	15,5 [13,75; 16,25]*	8,0 [7,75; 8,75]	16,0 [14,75; 17,0] *	10,5 [8,75; 11,25]	18,5 [17,75; 20,0] *
ИА, актов	2,0 [2,0; 3,0]	5,5 [4,0; 6,0] *	4,0 [3,75; 5,0]	7,0 [6,75; 8,0]*	3,0 [3,0; 4,0]	7,0 [6,75;8,0] *	4,0 [3,0; 5,0]	8,0 [7,75;9,0] *
ПМ, пф. ед.	2,34 [1,61-3,86]	8,41 [7,84;8,68] *	2,75 [0,89-3,87]	7,86 [6,65-8,78] *	2,57 [1,36-5,48]	6,62 [5,71-7,67] *	3,77 [2,93-4,38]	6,38 [5,77-6,81] *
НХр, ед./мм ²	36,44 [31,96-38,11]	9,91 [9,20-10,39] *	25,94 [25,21-26,73]	8,13 [7,57-8,69] *	34,10 [32,03-35,09]	6,17 [6,00-7,12] *	42,10 [40,45-43,10]	3,93 [3,64-4,40] *
МС, ед./мм ²	5,27 [4,43-5,55]	12,18 [11,09- 12,74] *	7,13 [6,41-7,87]	15,40 [14,85- 16,10]*	8,84 [7,73-10,14]	21,28 [20,36-23,83]*	14,26 [11,93-16,01]	24,88 [23,10-26,51]*
ПИ, мкм ²	557,13 [541,38- 582,23]	396,97 [388,64- 407,02]*	604,06 [593,48- 625,80]	280,64 [270,34- 288,87]*	734,66 [718,89- 744,00]	240,91 [230,83- 255,10]*	994,65 [968,38- 995,85]	194,55 [188,58-219,04] *
VEGF, ед./мм ²	13,50 [12,75; 15,0]	21,50 [20,75; 23,0] *	19,50 [18,0; 20,25]	32,00 [32,0; 38,0] *	30,00 [28,75; 31,00]	43,00 [41,75; 44,25] *	39,50 [38,00; 41,25]	56,50 [49,75; 59,25] *

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 2; НС – неврологический статус, ГА – горизонтальная активность, ИА – исследовательская активность, ПМ – показатель микроциркуляции, НХр – нейроны с хроматолизом, МС – мелкие сосуды, ПИ – площадь инфаркта, VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

При экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ в очаге повреждения во все сроки наблюдения увеличивается количество интактных нейронов, глиоцитов, мелких кровеносных сосудов, экспрессия VEGF, снижается количество нейронов с хроматолизом, клеток-теней, уменьшается площадь инфаркта.

Количество интактных нейронов, нейронов с хроматолизом, клеток-теней на всех сроках наблюдения частично, а мелких кровеносных сосудов с 7 суток полностью восстанавливается. Количество мелких кровеносных сосудов и количество глиоцитов на 14 и 30 сутки становится даже больше, чем в группе ложнооперированных животных. Итак, при комбинированном применении ЭПО и ЛИ восстановление кровеносных сосудов, снижение количества поврежденных нейронов и сокращение площади инфаркта начинается раньше, чем при монотерапии ЭПО или ЛИ. Кроме того, впервые зафиксировано увеличение количества глиоцитов в очаге ишемического повреждения, что может иметь значение в трофике и регенерации зоны повреждения.

При экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ в крови на 3, 7, 14 сутки повышается количество эритроцитов, снижается средний эритроцитарный объем, на 7 и 14 сутки повышается концентрация гемоглобина и гематокрит; максимальные изменения показателей наблюдаются на 7 сутки. Количество эритроцитов, концентрация гемоглобина и гематокрит полностью восстанавливаются с 3 суток наблюдения. На 3, 7, 14 сутки в крови снижается общее количество лейкоцитов за счет нейтрофилов и лимфоцитов, данные показатели на 3 и 7 сутки восстанавливаются частично, а на 14 и 30 сутки – полностью (таблица 3). Итак, системные гематологические изменения при ИКГМ корректируются уже на 3 сутки эксперимента для эритрона и на 14 сутки – для количества лейкоцитов, что, вероятно, отражает позитивный ход событий в очаге ишемии, нейропротекцию и ограничение площади инфаркта.

Полученные результаты по клиническим, инструментальным, морфологическим изменениям при экспериментальной ИКГМ, а также предполагаемые механизмы нейропротекторного действия ЭПО и ЛИ отражены на интегральной схеме (рисунок 1). Как видно, общим в механизме нейропротекторного действия как ЭПО, так и ЛИ выступают улучшение микроциркуляции за счет увеличения количества мелких кровеносных сосудов в очаге повреждения, восстановление количества интактных нейронов и уменьшение площади инфаркта, снижение количества лейкоцитов в крови, что приводит к частичному восстановлению неврологического и этологического статуса. Специфическим для ЭПО является эритропозитический эффект – увеличение количества эритроцитов, концентрации гемоглобина в крови, а для ЛИ – повышение экспрессии VEGF в очаге повреждения.

Влияние комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на гематологические показатели при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3])

Примечание: * – значимые ($p < 0,01$) различия с группой 2; RBC – эритроциты, HGB – гемоглобин, HCT – гематокрит, MCV – средний объем эритроцита, MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, WBC – лейкоциты, Neu – нейтрофилы, Lymph – лимфоциты, Mon – моноциты.

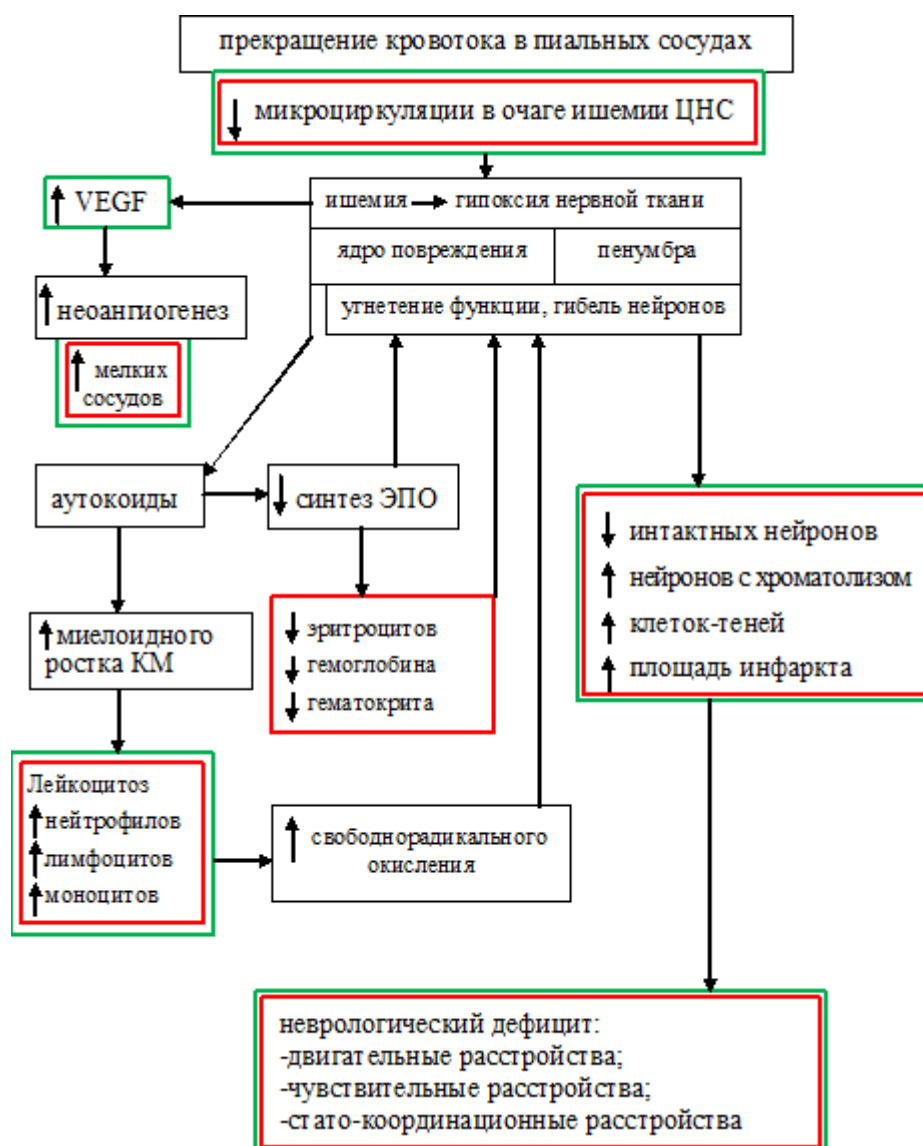


Рисунок 1 – Морфофункциональные изменения и предполагаемый механизм нейропротекторного действия ЭПО и ЛИ при экспериментальной ИКГМ (красным цветом для ЭПО, зеленым – для ЛИ выделены установленные точки приложения нейропротекторного действия)

ВЫВОДЫ

1. В динамике экспериментальной ИКГМ фиксируется очаговый неврологический дефицит, угнетается ориентировочно-исследовательская активность, в очаге повреждения прогрессивно от 3 к 30 суткам снижается количество интактных нейронов, мелких кровеносных сосудов, увеличивается количество нейронов с хроматолизом, клеток-теней, площадь инфаркта, экспрессия VEGF.

2. При экспериментальной ИКГМ показатель неврологического статуса по шкале Garcia J. H. снижается по мере снижения в крови количества эритроцитов, концентрации гемоглобина, повышения количества лейкоцитов, нейтрофилов.
3. Применение ЭПО при экспериментальной ИКГМ приводит на 3 и 7 сутки к частичному, а на 14 и 30 сутки к полному восстановлению неврологического статуса, микроциркуляции в очаге; во все сроки наблюдения в очаге ишемического повреждения увеличивается число интактных нейронов, мелких кровеносных сосудов, снижается количество нейронов с хроматолизом и клеток-теней, площадь инфаркта, не изменяется экспрессия VEGF.
4. ЭПО при экспериментальной ИКГМ с максимальной выраженностью на 7 сутки увеличивает в крови количество эритроцитов, концентрацию гемоглобина, гематокрит; на 3, 7 и 14 сутки частично, а на 30 сутки полностью восстанавливает представительство лейкоцитов в крови.
5. В условиях применения ЛИ при экспериментальной ИКГМ неврологический статус и ориентировочно-исследовательское поведение восстанавливаются к 30 суткам, микроциркуляция – на 14 сутки наблюдения, морфологические изменения в очаге ишемии максимально выражены на 30 сутки, количество мелких кровеносных сосудов в очаге ишемического повреждения нарастает по мере увеличения экспрессии VEGF.
6. Лазерная терапия при экспериментальной ИКГМ не изменяет показатели красной крови, на 7 и 14 сутки снижает в крови общее количество лейкоцитов за счет лимфоцитов, частично восстанавливает общее представительство лейкоцитов и лимфоцитов.
7. При экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ с 14 суток полностью восстанавливается неврологический статус и микроциркуляция в очаге ишемического повреждения, с 30 суток – ориентировочно-исследовательское поведение животных; во все сроки наблюдения в очаге повышается количество интактных нейронов, глиоцитов, мелких кровеносных сосудов, экспрессия VEGF, снижается площадь инфаркта, количество нейронов с хроматолизом и клеток-теней.
8. Комбинированное применение ЭПО и ЛИ при экспериментальной ИКГМ полностью восстанавливает в крови с 3 суток количество эритроцитов, концентрацию гемоглобина, с 14 суток – общее количество лейкоцитов и нейтрофилов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гиниатуллин, Р.У. Морфологические изменения ишемизированных тканей головного мозга крыс под воздействием рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения / Р.У. Гиниатуллин, А.И. Козель, Г.К. Попов, Л.В. Астахова, **А.Н. Кузьмин** // **Вестник Уральской медицинской академической науки.** – 2013. – № 4 (46). – С. 86-88.

2. Кузьмин, А.Н. Влияние рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения на морфометрические показатели ишемизированных тканей головного мозга крыс / А.Н. Кузьмин, Р.У. Гиниатуллин, А.И. Козель, Л.В. Астахова // Актуальные вопросы патологоанатомической практики: материалы научно-практической патологоанатомической конференции патологоанатомов Южного Урала, других регионов России и СНГ / под ред. профессора Е.Л. Казачкова. – Челябинск: Изд-во ЮУГМУ, 2014. – С. 48-51.
3. Гиниатуллин, Р.У. Экспериментальное обоснование нового метода лечения ишемии коры головного мозга у крыс / Р.У. Гиниатуллин, А.И. Козель, **А.Н. Кузьмин**, Г.К. Попов, Л.В. Астахова, А.М. Володченко, Е.Н. Игнатьева, Т.Г. Кравченко // **Вестник экспериментальной и клинической хирургии**. – 2014. – № 4 (VII). – С. 350-358.
4. Гиниатуллин, Р.У. Экспериментальное обоснование способов лечения ишемических нарушений в ЦНС / Р.У. Гиниатуллин, А.Н. Кузьмин, А.М. Володченко, А.И. Козель, Л.В. Астахова // Лазерная медицина. – 2014. – Т. 18, Вып. 4 – С. 16.
5. Кузьмин, А.Н. Применение рекомбинантного эритропоэтина в сочетании с лазерным излучением в лечении ишемического инсульта у крыс / А.Н. Кузьмин // Лазерная медицина. – 2014. – Т.18, Вып. 4 – С. 34.
6. Кузьмин, А.Н. Морфофункциональное обоснование способов лечения ишемических нарушений в ЦНС (экспериментальное исследование) / А.Н. Кузьмин, А.М. Володченко, Р.У. Гиниатуллин, А.И. Козель, Л.В. Астахова // О некоторых вопросах и проблемах современной медицины/ Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – Челябинск: Изд-во ИЦРОН, 2014. – С. 71-72.
7. Кузьмин, А.Н. Использование рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения при лечении ишемического инсульта у крыс в эксперименте / А.Н. Кузьмин // Актуальные вопросы хирургии (выпуск десятый): сборник научно-практических работ / под ред. профессора В.Н. Бордуновского. – Челябинск: Изд-во ЮУГМУ, 2014. – С. 293-295.
8. Кузьмин, А.Н. Рекомбинантный эритропоэтин в сочетании с лазерным излучением в лечении ишемического инсульта у крыс в эксперименте / А.Н. Кузьмин // II Международная научно-практическая конференция по нейрореабилитации в нейрохирургии: материалы конференции / под ред. профессора Н.Е. Ивановой и профессора В.И. Данилова. – Казань, 2014. – С. 97-98.
9. Кузьмин, А.Н. Морфологические изменения коры головного мозга крыс при лечении ишемического инсульта с использованием рекомбинантного эритропоэтина в сочетании с лазерным облучением / А.Н. Кузьмин // Актуальные вопросы патологоанатомической практики: материалы научно-практической патологоанатомической конференции патологоанатомов Южного Урала, других регионов России и СНГ / под ред. профессора

- Е.Л. Казачкова. – Челябинск: Изд-во ЮУГМУ, 2015. – С. 63-64.
10. Кузьмин, А.Н. Влияние рекомбинантного эритропоэтина в сочетании с лазерным излучением в лечении ишемического инсульта головного мозга крыс (экспериментальное исследование) / А.Н. Кузьмин // Бюллетень медицинских Интернет-конференций (ISSN 2224-6150). – 2015. – Т. 5, Вып. 3 – С. 173.
 11. Кузьмин, А.Н. Лечение экспериментальной ишемии коры головного мозга с применением рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения / А.Н. Кузьмин // XIV Научно-практическая конференция «Поленовские чтения»/ Сборник тезисов докладов. – Санкт-Петербург, 2015. – С. 91.
 12. Кузьмин, А.Н. Лечение экспериментальной ишемии коры головного мозга с применением рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения / А.Н. Кузьмин // VII Всероссийский съезд нейрохирургов / Сборник тезисов / под ред. профессора В.И. Данилова. – Казань, 2015. – С. 207.
 13. Кузьмин, А.Н. Роль рекомбинантного эритропоэтина в сочетании с лазерным излучением на течение ишемического инсульта у крыс в эксперименте / А.Н. Кузьмин // Актуальные вопросы неврологии: Всероссийская научно-практическая конференция / Сборник статей / под ред. профессора Г.Н. Бельской. – Челябинск, 2015. – С. 35.
 14. **Кузьмин, А.Н.** Влияние рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона на особенности течения ишемического инсульта у крыс / А.Н. Кузьмин, Р.У. Гиниатуллин, А.И. Козель, Л.В. Астахова // **Вестник Уральской медицинской академической науки.** – 2015. – № 4 (55). – С. 63-67.
 15. Кузьмин, А.Н. Оценка микроциркуляции в области экспериментального очага ишемии коры головного мозга при воздействии на него рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения / А.Н. Кузьмин // XV Юбилейная научно-практическая конференция «Поленовские чтения»: сб. тез. – Санкт-Петербург, 2016. – С. 97.
 16. Кузьмин, А.Н. Патологические и патоморфологические изменения в очаге ишемии головного мозга при воздействии рекомбинантного эритропоэтина в сочетании с лазерным излучением ближнего инфракрасного диапазона / Лазерные технологии в медицине: сб. науч.-практ. работ / А.Н. Кузьмин // под ред. А.И. Козеля, Р.У. Гиниатуллина. – Челябинск, 2016. – Вып. 6. – С. 16-22.
 17. Кузьмин, А.Н. Нейропротекторные аспекты применения рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения при ишемии коры головного мозга / А.Н. Кузьмин, Р.У. Гиниатуллин // Лазериндуцированные компенсаторно-приспособительные реакции в биологических тканях: монография / под ред. А.И. Козеля, Р.У. Гиниатуллина, Е.С. Головневой. – Челябинск, 2016. – С. 38-43.

18. Осиков, М.В. Оценка неврологического статуса и микроциркуляции при экспериментальной ишемии коры головного мозга в условиях комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения / М.В. Осиков, Р.У. Гиниатуллин, **А.Н. Кузьмин** // **Здоровье и образование в XXI веке**. – 2017. – Т. 19, № 9. – С. 175-179.
19. Осиков, М.В. Влияние эритропоэтина и лазерного излучения на неврологический статус и морфологию очага повреждения в динамике экспериментальной церебральной ишемии [электронный ресурс] / М.В. Осиков, Р.У. Гиниатуллин, **А.Н. Кузьмин** // **Современные проблемы науки и образования**. – 2017. – № 5 [https:// science-education.ru/ru/article/view?id=26782](https://science-education.ru/ru/article/view?id=26782).
20. Осиков, М.В. Нейропротекторный эффект эритропоэтина при экспериментальной ишемии головного мозга / М.В. Осиков, Р.У. Гиниатуллин, **А.Н. Кузьмин**, Е.В. Маркелова // **Человек. Спорт. Медицина**. – 2017. – Т. 17, № 4. – С. 41-49.
21. Осиков, М.В. Экспрессия фактора роста эндотелия сосудов и неоангиогенез при экспериментальной церебральной ишемии в условиях комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения / М.В. Осиков, Р.У. Гиниатуллин, **А.Н. Кузьмин** // **Уральский медицинский журнал**. – 2018. – № 2 (157). – С. 124-127.
22. Осиков, М.В. Гематологические показатели при экспериментальной ишемии коры головного мозга в условиях применения эритропоэтина [электронный ресурс] / М.В. Осиков, Р.У. Гиниатуллин, **А.Н. Кузьмин**, М.С. Бойко, Е.Д. Байсакалова // **Современные проблемы науки и образования**. – 2018. – № 5 [https:// science-education.ru/ru/article/view?id=27944](https://science-education.ru/ru/article/view?id=27944).
23. Пат. 2495688 Российская Федерация. Способ лечения ишемии головного мозга в эксперименте [Текст] А.И. Козель, Г.К. Попов, Р.У. Гиниатуллин, Л.В. Астахова, А.Н. Кузьмин, Е.Н. Игнатьева, Т.Г. Кравченко № 2495688 заявл. 28.03.2012; опубл. 20.10.2013.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГМ – головной мозг
 ИКГМ – ишемия коры головного мозга
 ИЛ-1 β – интерлейкин 1 бета
 ЛИ – лазерное излучение
 ФНО-альфа – фактор некроза опухоли альфа
 ЦНС – центральная нервная система
 ЭПО – эритропоэтин
 VEGF – фактор роста эндотелия сосудов