

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Осиков Михаил Владимирович
доктор медицинских наук, профессор

Гиниатуллин Равиль Усманович
доктор медицинских наук, профессор

Челябинск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭТИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ НАПРАВЛЕНИЯХ ТЕРАПИИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
1.1 Определение понятия, эпидемиология и этиология церебрального ишемического инсульта.....	15
1.2 Патогенез ишемического инсульта.....	19
1.3 Терапевтические подходы при церебральном ишемическом инсульте в клинических и в экспериментальных условиях.....	24
1.4 Эритропоэтин: общая характеристика, механизм плеiotропных эффектов.....	28
1.5 Механизм влияния лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона на биологические ткани.....	31
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1 Материалы исследования.....	38
2.2 Методы исследования.....	41
2.2.1 Оценка неврологического статуса животных.....	41
2.2.2 Оценка поведения животных в актографе «открытое поле».....	43
2.2.3 Оценка микроциркуляции в интактных и ишемизированных тканях коры головного мозга методом лазерной доплеровской флуориметрии...	44
2.2.4 Гематологические методы исследования.....	45
2.2.5 Определение концентрации эритропоэтина.....	45
2.2.6 Морфологические и иммуногистохимические методы исследования.....	46
2.2.7 Статистические методы исследования.....	47

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И	
ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	48
3.1 Морфофункциональные изменения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	48
3.1.1 Морфологическая верификация и экспрессия VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	48
3.1.2 Неврологический и этологический статус крыс при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	56
3.1.3 Оценка микроциркуляции в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	61
3.1.4 Гематологические показатели и концентрация эритропоэтина в крови при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	62
3.2 Нейропротекторные аспекты применения эритропоэтина при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	70
3.2.1 Влияние эритропоэтина на неврологический и этологический статус крыс при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	70
3.2.2 Влияние эритропоэтина на микроциркуляцию в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	74
3.2.3 Влияние эритропоэтина на морфологию и экспрессию VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	75
3.2.4 Влияние эритропоэтина на гематологические показатели крови при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	80
3.3 Нейропротекторные аспекты применения лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	86
3.3.1 Влияние лазерного излучения на неврологический и этологический статус крыс при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	86
3.3.2 Влияние лазерного излучения на микроциркуляцию в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	89

3.3.3 Влияние лазерного излучения на морфологию и экспрессию VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	91
3.3.4 Влияние лазерного излучения на гематологические показатели крови при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	96
3.4 Нейропротекторные аспекты комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	101
3.4.1 Влияние комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на неврологический и этологический статус крыс при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	101
3.4.2 Влияние комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на микроциркуляцию в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	105
3.4.3 Влияние комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на морфологию и экспрессию VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	106
3.4.4 Влияние комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на гематологические показатели крови при экспериментальной ишемии коры головного мозга.....	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	116
ВЫВОДЫ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

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 [64, 154, 276, 287]. Доля последних в структуре общей смертности в нашей стране составляет 21,4%, а инвалидизация после перенесенного инсульта достигает 3,2 на 10 000 населения, занимая первое место среди всех причин первичной инвалидности [67, 80, 83]. Заболеваемость инсультом составляет 2,5–3,0 случая на 1 000 населения в год, частота мозговых инсультов у лиц старше 50–55 лет увеличивается в 1,8–2,0 раза в каждом последующем десятилетии жизни. В Российской Федерации инсульт ежегодно развивается более чем у 450 тыс. человек, из них примерно 35% умирают в остром периоде заболевания [25, 64, 67].

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. [93, 99, 109, 164, 171, 214, 227]. 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 [242, 271]. Нейропротективные подходы в настоящее время занимают ключевую позицию в терапии ишемических поражений ЦНС [8, 9, 192, 236, 237]. 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 плейотропных эффектах данного гликопротеина [100, 217, 305]. 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 [53, 54, 55, 113, 212, 233].

Известно, что лазерное низкоинтенсивное воздействие на ткани стимулирует пролиферативную активность клеток, снижает выраженность апоптоза и некроза в культурах клеток ЦНС, усиливает микроциркуляцию и неоангиогенез, активирует метаболизм клеток и утилизацию кислорода в поврежденных тканях [16, 17, 19, 20, 79, 139, 153, 159]. Указанные сведения предполагают нейропротекторный эффект ЭПО и лазерного излучения (ЛИ) при ишемических поражениях головного мозга 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 статус, количественный состав клеток и концентрацию эритропоэтина в крови в динамике экспериментальной ишемии коры головного мозга.

2. Изучить влияние эритропоэтина на неврологический 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 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 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. Продemonстрировано, 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 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, индуцированной диатермокоагуляцией пияльных сосудов: роль изменений микроциркуляции, морфологии очага повреждения и экспрессии в нем VEGF, количественного

состава лейкоцитов и эритроцитарных индексов. Установлена нейропротекторная роль комбинированного применения ЭПО и ЛИ при экспериментальной ишемии коры головного мозга, 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 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, к 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. 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.

Организация исследования одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (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.

Ишемию коры головного мозга (ИКГМ) у крыс моделировали под общим наркозом («Золетил», МНН: тилетамина гидрохлорид, золазепам гидрохлорид, Франция) по методике, описанной Chen S. T., путем диатермокоагуляции пиальных сосудов коры головного мозга по периметру трепанационного отверстия в области задних отделов левой лобной доли и передних отделов левой теменной доли головного мозга (прецентральные и постцентральные извилины левого полушария головного мозга) [127]. 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: эпозтин 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 рекомбинантный ЭПО, как в группе 3. Исследования проводили на 3, 7, 14, 30 сутки после ИКГМ.

Забор крови осуществляли под общим наркозом («Золетил», МНН: тилетамина гидрохлорид, золазепам гидрохлорид, Франция) после вскрытия грудной клетки пункцией сердца в области левого желудочка. Исследование морфологии очага ишемии проводили через 3, 7, 14, 30 суток после моделирования ишемии. Для достижения цели и решения поставленных задач исследования использованы следующие методы: экспериментального моделирования, оценки неврологического статуса по шкале Garcia J. H., этологического статуса в актографе «открытое поле», доплеровской флуориметрии для оценки микроциркуляции в очаге ишемии, гематологические, иммуноферментного анализа, морфологические и иммуногистохимические,

статистические.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе наблюдений экспериментального фрагмента работы, 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 по нейрореабилитации в нейрохирургии (Казань, 2014), на XIV научно-практической конференции «Поленовские чтения» (Санкт-Петербург, 2015), VII Всероссийском съезде нейрохирургов (Казань, 2015), на Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы неврологии» (Челябинск, 2015), 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 в диссертационном исследовании на всех его этапах. Определение основной идеи, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, постановку цели и задач, разработку дизайна исследования, проводилось 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 ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России и ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава Челябинской области.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России и кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, научную работу кафедры патологической физиологии, НОЦ «Проблемы фундаментальной медицины» ФГБОУ ВО ЮУГМУ 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), 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).

ГЛАВА 1

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭТИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ НАПРАВЛЕНИЯХ ТЕРАПИИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Определение понятия, эпидемиология и этиология церебрального ишемического инсульта

Церебральный инсульт представляет собой клинический синдром острого нарушения мозгового кровообращения, характеризующийся возникновением очагового и/или общемозгового неврологического дефицита, который сохраняется более 24 часов и развивается в результате церебральной ишемии или геморрагии [11, 23, 24, 25, 137]. В отличие от транзиторной ишемической атаки, инсульт характеризуется морфологическими проявлениями инфаркта головного мозга или внутримозговой гематомы по данным нейровизуализационных методов исследования головного мозга, таких как КТ и МРТ головного мозга, КТ и МРТ-перфузия головного мозга, церебральная ангиография, КТ-ангиография сосудов головного мозга [5, 6, 165, 199, 246]. Ежегодный показатель заболеваемости инсультом в России составляет 400–450 тыс. случаев. При этом на долю ишемического инсульта приходится до 80% всех случаев инсульта [24]. Таким образом, заболеваемость ишемическим инсультом в России составляет 320–340 тыс. случаев в год [83, 84]. По данным Всемирной организации здравоохранения, инсульт занимает второе место в мире среди причин смертности. Показатель смертности от инсульта за 2011 г. составил 6,2 миллиона человек [26]. Ежегодная смертность от инсульта в РФ составляет 374 случая на 100 тыс. населения [80].

Гипертоническая болезнь, артериальная гипертензия различного генеза, атеросклероз внечерепных и внутричерепных сосудов являются заболеваниями, на фоне которых развивается инсульт. Кроме этого, инсульт может развиваться на фоне ревматизма, васкулитов различной этиологии, аневризм, болезней крови,

острых инфекций, злокачественных опухолей, интоксикаций, отравлений, врожденных пороков сердца, инфаркта миокарда, токсикозов второй половины беременности, эклампсии, сахарного диабета, травмы сосудов головы и шеи, шейного остеохондроза, сочетающегося с атеросклерозом позвоночных артерий, патологической извитости сонных артерий и др. [5, 83].

Ишемический инсульт наиболее часто наблюдается у лиц среднего и пожилого возраста; у мужчин отмечается несколько чаще, чем у женщин. Развитию инсульта нередко предшествуют преходящие нарушения мозгового кровообращения – так называемые транзиторные ишемические атаки, которые проявляются нестойкими очаговыми симптомами [5]. Обычно они являются следствием кратковременного дефицита кровоснабжения головного мозга в той области, где позднее развивается инфаркт. При тромбозах мозговых сосудов нередкими предвестниками ишемического инсульта выступают головокружение, кратковременное расстройство сознания (полуобморочное состояние), потемнение в глазах. Инсульт может развиваться в любое время суток, но наиболее часто он возникает утром или ночью. Иногда устанавливается связь начальных проявлений инсульта с предшествовавшей повышенной физической нагрузкой, воздействием эмоционального фактора, употреблением алкоголя, приемом горячей ванны, кровопотерей или каким-либо заболеванием, в частности инфекционным. Острое развитие ишемического инсульта может наблюдаться при тромбозе интракраниальной части внутренней сонной артерии или при острой эмболии бассейна внутренней сонной артерии и проявляется сочетанием очаговых симптомов с выраженной общемозговой симптоматикой.

Характерной чертой ишемического инсульта является преобладание очаговых симптомов над общемозговыми, последние могут отсутствовать [82, 83]. Очаговые симптомы определяются локализацией и размерами ишемического инсульта, пораженным сосудом и условиями коллатерального кровообращения.

В зависимости от причины возникновения ишемического инсульта его подразделяют на атеротромботический, эмболический, гемодинамический инсульт, а также инсульт по типу гемореологической окклюзии [11, 23, 25, 83].

Причиной атеротромботического инсульта является тромбоз церебральных и прецеребральных артерий. Атеротромботический инсульт возникает на фоне атеросклероза церебральных и прецеребральных артерий крупного или среднего калибра. Тромбообразование формируется вокруг атеросклеротической бляшки, суживающей просвет сосуда. Этот тип ишемического инсульта развивается ступенеобразно, с нарастанием симптоматики на протяжении нескольких часов или суток, часто дебютирует во сне. Нередко атеротромботическому инсульту предшествуют транзиторные ишемические атаки. Выделяют 2 типа тромбоза, которые могут быть причинами атеротромботического инсульта:

1. Тромбоз в крупных церебральных и прецеребральных артериях, таких как общая и внутренняя сонная артерия, позвоночные артерии и сосуды Виллизиева круга. Причинами формирования тромбов в этих артериях являются атеросклероз, вазоконстрикция, диссекция аорты, сонных (общей или внутренней) или позвоночной артерий, васкулиты различной этиологии (артериит Такаяши, гигантско-клеточный артериит), невоспалительная васкулопатия, болезнь Мойя-мойя и фибромускулярная дисплазия.

2. Тромбоз мелких артериальных ветвей головного мозга: перфорантные артериальные ветви Виллизиева круга, средней мозговой артерии и базилярной артерии, идущие к стволу головного мозга. Причинами формирования тромбов в этих мелких артериях являются липогиалиноз, фибриноидная дегенерация и мелкие атеросклеротические бляшки. Тромбоз этих мелких перфорантных ветвей головного мозга является причиной развития лакунарного инсульта, локализованного в подкорковых структурах головного мозга.

Эмболический инсульт возникает при закупорке эмболом артерии головного мозга. В головной мозг могут заноситься с током крови частицы с измененных клапанов сердца или из пристеночных тромбов при инфаркте миокарда. При эндокардите может возникать бактериальная эмболия; последняя может произойти при атероматозном изъязвлении восходящей части дуги аорты или сонной артерии (отрыв частички пристеночного тромба). Иногда происхождение эмбола связано с венами большого круга кровообращения (при

тромбофлебитах и тромбозах вен брюшной полости, малого таза и др.) при незаращении овального отверстия межпредсердной перегородки. Жировая эмболия наблюдается при переломе длинных трубчатых костей или при операциях, связанных с большой травматизацией подкожной жировой клетчатки. Газовая эмболия возникает при операциях на легких, при возникновении пневмоторакса, при кессонных работах. При эмболии артерий головного мозга нарушается кровоснабжение в зоне васкуляризации. В дистальных корковых ветвях при этом происходит запускание капилляров, появляется неравномерность просвета и извитость сосудов вследствие изменения тонуса и отек мозга. Если при исчезновении рефлекторного спазма эмбол продвигается дальше, то кровоснабжение в артерии восстанавливается, и кровоток выключается только в мелких корковых ветвях.

Гемодинамический инсульт обусловлен гемодинамическими факторами: снижением артериального давления (физиологическим, например, во время сна; ортостатической, ятрогенной артериальной гипотензией, гиповолемией) или падением минутного объема сердца (вследствие ишемии миокарда, выраженной брадикардии и т. д.). Начало гемодинамического инсульта может быть внезапным или ступенеобразным, в покое или активном состоянии пациента. Размеры инфарктов различны, локализация обычно в зоне смежного кровоснабжения (корковая, перивентрикулярная и др.). Гемодинамические инсульты возникают на фоне патологии экстра- и/или интракраниальных артерий (атеросклероз, септальные стенозы артерий, аномалии сосудистой системы мозга) [11, 82].

Причиной инсульта по типу гемореологической микроокклюзии служат выраженные гемореологические изменения, нарушения в системе гемостаза и фибринолиза. Характерна скудная неврологическая симптоматика в сочетании со значительными гемореологическими нарушениями [82].

1.2 Патогенез ишемического инсульта

Каскад биохимических изменений, разворачивающихся после ишемии головного мозга, инициируется нарушением кровотока в отдельном сосудистом бассейне головного мозга. Уменьшение мозгового кровотока влечет за собой значительное ограничение поступления в ткань головного мозга кислорода и глюкозы. При снижении уровня кровотока до 70–80% (менее 50–55 мл на 100 г ткани мозга в 1 мин) развиваются поэтапные нарушения перфузии головного мозга. Снижение белкового синтеза при этом уровне кровотока может быть обусловлено диссоциацией полисом [169, 170]. Дальнейшее снижение кровотока до 50% от нормальной величины (до 35 мл на 100 г ткани мозга в 1 мин) сопровождается активацией анаэробного гликолиза, увеличением концентрации лактата, развитием лактат-ацидоза и тканевого цитотоксического отека, что сопровождается нарушением структуры мембраны клетки, функции мембранных ионных насосов [23, 118, 149]. Нарастающая ишемия головного мозга (снижение кровотока до 20 мл на 100 г в 1 мин) приводит к снижению синтеза АТФ, дисфункции каналов активного ионного транспорта, избыточной секреции глутамата и аспартата, формированию энергетической недостаточности и как следствие к гидрофильному отеку и некрозу клеток.

Область головного мозга с наиболее выраженным снижением кровотока (менее 10 мл на 100 г в 1 мин) необратимо повреждается в течение 6–8 мин с момента развития острого нарушения мозгового кровотока («ядро» ишемии). В течение нескольких часов «ядро» ишемии окружено ишемизированной тканью – зоной «ишемической полутени», или пенумбры [171]. В области пенумбры сохранен энергетический метаболизм и имеются только функциональные повреждения, проявляющиеся угнетением функции нейронов в виде снижения передачи нервного импульса в синапсе, характеризующиеся потенциально обратимым неврологическим дефицитом [169, 170]. Область пенумбры имеет перфузию на уровне порога функционального повреждения и морфологической целостности, а также резерв к восстановлению, если перфузия улучшится [248].

Пенумбра является динамической областью, которая зависит от остаточной перфузии и продолжительности нарушения кровотока и может преобразовываться со временем в необратимое нейрональное повреждение, прогрессирующее от «ядра» ишемии к окружающим тканям с менее тяжелой, но критической гипоперфузией [164]. За счет зоны пенумбры происходит постепенное увеличение размеров инфаркта. Для сохранения морфологической структуры нейронов необходимое потребление кислорода составляет около 65 ммоль / 100 г ткани / 1 мин. При этом порог мозгового кровотока колеблется между 5 и 12 мл / 100 г ткани в 1 мин [164]. Границы мозгового кровотока для пенумбры находятся между 14 и 22 мл / 100 г ткани / 1 мин [290].

Формирование большей части зоны инфаркта при фокальной ишемии заканчивается через 3–6 ч с момента появления первых клинических симптомов инсульта. Продолжительность формирования морфологических признаков ишемического повреждения зависит от селективной чувствительности нейронов к ишемии в различных структурах головного мозга, степени развития в ней коллатерального кровотока [109]. Отметим, что нейроны различных отделов головного мозга имеют различную чувствительность к ишемии в зависимости от особенностей кровоснабжения определенных зон головного мозга. Самые чувствительные к ишемии клетки головного мозга – это клетки гиппокампа, коры головного мозга (особенно 3, 5, 6 слои глубинных отделов теменно-затылочных борозд коры головного мозга), базальных ганглиев (хвостатое ядро и скорлупа), клетки ствола головного мозга, а также клетки Пуркинье в мозжечке. Наименее уязвимыми к ишемии структурами головного мозга являются белое вещество U-волокон, наружная и наружнейшая капсулы и ограда. Это связано с лучшим коллатеральным кровоснабжением этих структур головного мозга [130].

Применение иммуногистохимических методов исследования, использование метаболических красителей, применение МРТ и ПЭТ-методов визуализации выявило, что формирование инфаркта продолжается на протяжении длительного времени: 28–72 ч с момента развития инсульта, возможно и дольше с учетом влияний сохраняющегося отека головного мозга и других отдаленных

последствий ишемии. Ишемическое повреждение клеток может быть диагностировано с помощью диффузионной магнитно-резонансной томографии (МРТ), КТ и МРТ-перфузии головного мозга. При проведении МРТ головного мозга в сроки до 12 часов от момента развития ишемического инсульта очаг ишемического повреждения головного мозга выглядит гипоинтенсивно в T1-режиме и гиперинтенсивно в T2-режиме, в виде отека головного мозга в диффузионном режиме [130]. КТ и МРТ-перфузия головного мозга на данном этапе снижения кровотока позволяет выявить степень уменьшения скорости и объема мозгового кровотока в пораженной ткани головного мозга, а также среднее время транзита мозгового кровотока в сосудах пораженных отделов головного мозга.

Основными звеньями патогенеза церебральной ишемии является снижение синтеза АТФ, угнетение аэробного и активация анаэробного пути утилизации глюкозы, запускаящие каскад патобиохимических реакций. Происходит нарушение активного транспорта ионов через мембраны с раскрытием агонист-зависимых Ca^{2+} -каналов, контролирующихся рецепторами, активирующимися возбуждающими нейротрансмиттерами глутаматом и аспартатом [205]. Происходит увеличение концентрации свободного кальция в цитоплазме, что приводит к деполяризации клеточных мембран и гибели нейронов путем некроза [51, 108, 116, 261]. Значительное высвобождение глутамата происходит лишь в случае достаточно тяжелой церебральной ишемии – в зоне «ишемического ядра» (центрального инфаркта) [214]. Глутамат-кальциевый каскад запускается избыточным высвобождением глутамата и аспартата из окончаний ишемизированных нейронов в межклеточное пространство вследствие нарушений активного ионного транспорта и деполяризации пресинаптических мембран [162, 257].

Отсутствие в клетке кислорода – конечного акцептора электронов – полностью тормозит активность окислительно-восстановительных процессов в дыхательной цепи, приводя к естественному падению синтеза АТФ. Недостаточность аэробного окисления активирует гликолиз и ведет к

гиперпродукции пировиноградной и молочной кислот, однако при этом потребности клетки в макроэргах не компенсируются, энергетический дефицит прогрессирует.

Нарастание ацидоза происходит вследствие накопления недоокисленных продуктов углеводного и липидного обмена, гидролиза АТФ и других макроэргических соединений в результате восстановления НАД и НАДФ до НАД•Н и НАДФ•Н, а также из-за снижения синтеза АТФ. Снижение pH тормозит гликолиз за счет ингибирования ключевых ферментов (фосфофруктокиназа) и ведет к необратимому энергетическому дефициту. Ацидоз угнетает метаболические процессы и ионный транспорт, приводит к внутриклеточному накоплению свободных ионов Ca^{2+} и запуску реакций глутамат-кальциевого каскада, развитию клеточного отека, в конечном итоге приводит к аноксической деполяризации клеточной мембраны и некрозу клетки [4, 172].

На фоне повышенной кислотности среды происходят ускоренное образование продуктов ПОЛ и активация оксидативного стресса. Источниками активных форм кислорода при ишемии служат гипоксантин, образующийся при деградации АТФ при пониженном pH и являющийся субстратом для ксантиноксидазы, восстановленные ионы Fe^{2+} и высвобожденный из митохондрий цитохром С, а также инфильтрация очага повреждения нейтрофилами. Активные формы кислорода генерируются при гипоксии и за счет фагоцитирующих клеток, мигрирующих в область ишемии, в метаболических реакциях арахидоновой кислоты, посредством активации наработки пероксинитрита. Накопление свободных радикалов приводит к повреждению митохондрий, угнетению цитохромоксидазы, цитохромов а–а₃. Это ведет к прогрессирующему снижению концентрации макроэргов и накоплению аденозинмонофосфата (АМФ), который активизирует протеинкиназную систему, усугубляя тем самым процессы деструкции клеточных мембран.

Вслед за аноксической деполяризацией нейрональной мембраны наблюдается выброс глутамата в экстрацеллюлярное пространство. Показано, что выброс глутамата и допамина во внеклеточное пространство в первые минуты

ишемии является триггерным механизмом развития повреждений коры головного мозга [114, 214]. В условиях ишемии дисфункция каналов активного ионного транспорта приводит к нарушению высокоселективной системы транспорта глутамата и аспартата из синаптической щели в астроглию [4, 21, 51]. Абсолютная концентрация и время пребывания глутамата и аспартата в синаптической щели превышают допустимые пределы, процесс деполяризации мембран нейронов приобретает необратимый характер, что приводит к «эксайтотоксичной гибели нейронов» [227, 231].

Астроциты являются наиболее распространенным типом клеток в центральной нервной системе. Будучи одними из важнейших структурно-функциональных частей трехсторонних синапсов и нейрососудистой единицы, они играют существенную роль в поддержании нормальной функции головного мозга за счет взаимодействия с нейронами, олигодендроцитами и эндотелиальными клетками, участвуют в переносе энергии, проявляют антиоксидантную активность, захватывают и перерабатывают нейротрансмиттеры, синтезируют трофические факторы, участвуют в поддержании ионного гомеостаза [51, 99, 263].

При развитии ишемического инсульта роль астроцитов двойственна и до конца не изучена. Имеются данные, что астроциты участвуют в эндогенной нейропротекции, ограничивая расширение зоны поражения, препятствуя эксайтотоксичности, поглощая глутамат и аспартат во внеклеточном пространстве, тем самым определяя выживаемость нейронов в зоне пенумбры. Секретируя ангиогенные и нейротрофические факторы (VEGF, эритропоэтин), астроциты стимулируют неоангиогенез, участвуют в ремоделировании синапсов и аксонов, тем самым способствуя восстановлению неврологического дефицита [270]. В связи с вышесказанным, астроциты рассматриваются как терапевтические мишени для улучшения функционального исхода инсульта [93, 99, 202].

Таким образом, церебральная ишемия при инсульте запускает комплекс патофизиологических процессов, происходящих в очаге повреждения:

оксидативный стресс, ацидоз, глутаматную эксайтотоксичность и др., – в конечном итоге приводящих к аноксической деполяризации клеточных мембран и гибели нейронов [286].

1.3 Терапевтические подходы при церебральном ишемическом инсульте в клинических и в экспериментальных условиях

Глубокое понимание механизмов развития инсульта позволило сформулировать положение о динамическом характере и потенциальной обратимости церебральной ишемии, о необходимости в связи с этим проведения неотложных мероприятий по сочетанному восстановлению кровотока и защите головного мозга от ишемического поражения [22, 23, 25, 50, 64]. В Российской Федерации, как и за рубежом, для оказания помощи больным с инсультом разработана система этапной помощи, включающая догоспитальный этап (помощь оказывается специально подготовленными врачами скорой медицинской помощи), этап интенсивной терапии, этап восстановительного лечения и диспансерный этап [5, 84]. На этапе интенсивного лечения исключительное значение приобретает неотложная дифференцированная терапия. Восстановление мозгового кровотока при острой фокальной ишемии головного мозга наиболее эффективно в первые минуты после развития инсульта. Чем продолжительнее дореперфузионный период, тем меньше вероятность быстрой нормализации микроциркуляции в ишемизированной зоне и тем выше риск дополнительного реперфузионного повреждения мозговой ткани. Целесообразность и безопасность реперфузии сохраняется в пределах 3–6 часов [134, 155, 157, 158].

К настоящему времени изучены возможности ряда тромболитических препаратов [134, 149, 156, 157, 158, 295]. При этом показана эффективность рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (rt-PA) при его введении в течение 4,5 часов от начала развития ишемического инсульта [134, 175]. Внутривенное введение rt-PA в дозе 0,9 мг/кг в первые 4,5 ч от начала ишемического инсульта – системный тромболизис – получило самый высокий

уровень доказательности (класс I, уровень A) и рекомендовано к применению как в европейских (ESO), так и в североамериканских (AHA-ASA) руководствах по ведению пациентов с острым ишемическим инсультом [175]. Фибринолитический препарат проурокиназа улучшает клинический исход инсульта при введении в первые 6 часов после развития заболевания [133].

Назначение с целью реперфузионной терапии антиагрегантного препарата ацетилсалициловой кислоты в течение первых 48 ч от развития неврологической симптоматики при остром ишемическом инсульте также обладает самым высоким уровнем доказательности (класс I, уровень A) [123, 273]. Это позволило рекомендовать как можно более раннее назначение препаратов ацетилсалициловой кислоты при остром развитии ишемического инсульта [175]. При этом применение препаратов ацетилсалициловой кислоты в остром периоде ишемического инсульта не является альтернативой тромболитической терапии. Также не рекомендовано применение препаратов ацетилсалициловой кислоты в течение первых 24 ч после проведения системного тромболизиса [175].

В ряде исследований была доказана безопасность и эффективность комбинированной тромболитической терапии в сравнении с внутриартериальной при лечении ишемического инсульта [197]. В то же время было показано, что в группе внутриартериальной тромболитической терапии чаще отмечались лучшие по сравнению с плацебо функциональные исходы (41,5% против 23% соответственно) [195, 201]. В настоящее время более эффективной по сравнению с внутриартериальной тромболитической терапией является методика механической реканализации пораженного участка артерии специальным инструментом – тромбоэмболэктомия [228, 250, 262, 266].

Экспериментальные данные подтверждают важный вывод о разном темпе развития необратимых изменений в полушариях и стволе головного мозга в условиях редуцированного кровотока [121, 161]. Области, в которых локализовались дыхательные и кардиоваскулярные центры, были наиболее устойчивы к ишемии [161]. Данные факторы делают возможным проведение тромболитической терапии за пределами 4,5-часового «терапевтического окна»

пациентам с инсультом в вертебрально-базиллярной системе [105, 141, 156, 200, 238, 239].

Впервые в РФ методы системного селективного внутриаартериального тромболизиса были внедрены в клинике НИИ цереброваскулярной патологии и инсульта Российского государственного медицинского университета на базе ГКБ № 31 в 2005–2006 гг. [72, 73]. В целом, результаты безопасности и эффективности внедрения метода тромболитической терапии в РФ сопоставимы с таковыми в наиболее крупных международных исследованиях [74, 260].

Таким образом, фибринолитические и антиагрегантные препараты, не оказывая радикального реперфузионного действия, улучшают микроциркуляцию в ткани мозга, а также снижают риск венозного тромбоза и эмболии легочной артерии, что служит основанием для их применения в первые дни ишемического инсульта [25, 33, 50, 175].

Экспериментальные и клинические исследования продемонстрировали, что раннее применение нейропротекторов позволяет уменьшить размеры зоны инфаркта головного мозга, увеличить период «терапевтического окна», расширить возможности для тромболитической терапии, защитить мозговую ткань от реперфузионного повреждения, предупредить трофическую дисфункцию ткани головного мозга [7, 8, 9, 12, 22, 23, 52, 71, 147, 177, 256, 285]. Первичная нейропротекция начинается с момента развития заболевания и направлена на прерывание глутамат-кальциевого каскада. Испытания магнезии в качестве первичного нейропротективного препарата показали ее безопасность, отсутствие значимых побочных эффектов и снижение 30-дневной летальности [196, 223, 251]. К первичным нейропротекторам относится также блокатор натриевых каналов лубелузол, применение которого в первые 6 часов заболевания сопровождается снижением летальности и увеличением числа больных с хорошим восстановлением неврологических функций через 3 месяца после инсульта. Естественным активатором тормозных нейротрансмиттерных систем является препарат глицин, содержащий в качестве активного вещества аминокислоту глицин. Глицин также обладает метаболическим действием,

устраняет дисбаланс между возбуждающими и тормозными медиаторными системами, уменьшает выраженность процессов оксидантного стресса [23]. В экспериментальном исследовании Л. С. Онищенко и др. (2006) было проведено сравнение морфологических изменений в очаге воспроизведенного ишемического инсульта у крыс под воздействием препаратов нейротрофической группы (альфа-GPC, церебролизин), обладающих ноотропными свойствами (пирацетам) и смешанного действия (винпоцетин) [52]. Препараты вводили сразу после операции, а затем 1 раз в сутки. Время реперфузии составляло 48 часов. При применении альфа-GPC или церебролизина увеличивалась толерантность нейронов к ишемическому повреждению и замедлялось выполнение программы клеточной гибели [163, 168, 241, 292, 304]. При применении пирацетама и винпоцетина все выявленные электронно-микроскопические признаки указывали на недостаточное обеспечение энергоемких процессов репарации в острой стадии ишемического инсульта [289]. При этом выявлялись признаки апоптоза глиоцитов с нарушением их пролиферации, патология миелина и безмиелиновых волокон [132].

В экспериментальном исследовании Д. Н. Силачева (2009) было проведено изучение действия новых нейропротекторов (хлорида лития, ГК-2, SKQ, PGP) на модели фокальной ишемии головного мозга у крыс [71]. Показано, что данные препараты оказывают нейропротекторное действие – уменьшают развитие ишемического дефицита в постишемическом периоде, что позволяет рекомендовать их для дальнейших доклинических испытаний.

Вторичная нейропротекция должна быть начата через 6–12 часов после развития инсульта и проводиться на протяжении первых 7 суток заболевания. В проведенных экспериментальных и клинических исследованиях установлена эффективность отечественных препаратов эмоксина и мексидола, тормозящих перекисное окисление липидов, активизирующих антиоксидантные системы и обладающих антигипоксическим действием [13, 14, 25, 43, 68]. Эффективным препаратом, обладающим вторичным нейропротективным действием, является синтетический аналог АКТГ – семакс. Данный препарат обладает

нейромодуляторной и нейротрофической активностью, выраженным ноотропным действием [1, 25].

С первых часов и дней этапа интенсивной терапии важную роль играет восстановительное лечение. Одним из важных направлений является медикаментозная терапия, предусматривающая назначение препаратов, обладающих трофическими и модуляторными свойствами и усиливающих регенераторно-репаративные процессы (нейротрофические препараты – церебролизин и производные ГАМК и др.) [23, 25, 163, 168, 188].

Несмотря на большое количество положительных результатов применения нейропротекторной терапии при ишемическом инсульте, на сегодняшний день эффективность применения имеющихся нейропротекторных препаратов является недостаточно изученной с позиций доказательной медицины [64, 70, 71, 175]. Поэтому разработка новых подходов к терапии ишемического инсульта является актуальной и востребованной задачей современной медицины.

1.4 Эритропоэтин: общая характеристика, механизм плейотропных эффектов

Известно, что эритропоэз регулируется в том числе гликопротеиновым гормоном эритропоэтином (ЭПО), который вырабатывается в почках и в меньшей степени (до 15% от общего количества) в печени [41, 111, 264]. Клетки, синтезирующие ЭПО, представляют собой интерстициальные фибробласты в корковом веществе почек, они непосредственно примыкают к эпителию проксимальных канальцев. От 5 до 15% ЭПО вырабатывается гепатоцитами и печеночными фибробластоподобными клетками [3, 104].

В экспериментальных и клинических исследованиях было показано, что ЭПО является мультифункциональным трофическим фактором, имеет различные сайты экспрессии, специфическую тканевую регуляцию и целый ряд различных механизмов действия. Рецепторы к ЭПО найдены не только на мембранах клеток красного ростка костного мозга, но и на клетках миелоидного ряда, лимфоцитах,

мегакариоцитах, на мезангиальных, миокардиальных, гладкомышечных клетках, а также на эндотелиоцитах, нейронах и глиальных клетках центральной и периферической нервной системы [96, 110, 119, 128, 221, 225, 243, 255, 269, 280, 281, 293].

ЭПО является кислым гликопротеидом, состоящим из цепи 165 аминокислот и карбоангидратной части, активно гликозилирован [3, 264]. Карбоангидратная часть состоит из одного О- и трех N-связанных олигосахаридов, на концах которых имеются сиаловые группы, обеспечивающие биологическую активность всей молекулы. Время полураспада ЭПО в крови у человека составляет 6–8 часов. У здоровых взрослых людей уровень ЭПО в плазме крови варьирует от 4,1 до 19,5 МЕ/мл [151]. Запасов ЭПО в организме не обнаружено. Образование ЭПО в организме не индуцируется посредством нервной и гуморальной регуляции [2, 104].

Показано, что дериваты ЭПО (значение имеет только рекомбинантный ЭПО, полученный из клеток животных) лишены влияния на эритропоэз при сохранении других плеiotропных свойств препарата, что и создает перспективы их широкого использования в клинической практике [3, 144].

Главным фактором, регулирующим продукцию ЭПО, выступает гипоксия. При гипоксии количество циркулирующего в плазме ЭПО увеличивается примерно в 1 000 раз [104, 226, 264]. В ответ на снижение содержания кислорода фактор индукции гипоксии (HIF-1 α) активирует выработку ЭПО [112, 144]. Гипоксия приводит к снижению уровня кислорода в специфических сенсорных клетках почек, что вызывает усиление продукции простагландинов в клубочковых клетках [203, 234, 265]. В свою очередь индукция активности фосфолипазы A2 в условиях гипоксии приводит к возрастанию уровня арахидонатов, которые при участии циклооксигеназы превращаются в эндопероксиды, при этом ЭПО имеет прямое влияние на метаболизм арахидоновой кислоты, осуществляемый липоксигеназной системой в нормальных эритроидных предшественниках из печени эмбриона мыши [107, 190]. Вероятно, в этих биохимических изменениях важную роль играет

кальциевая система: ионы кальция стимулируют активность фосфолипазы A2 и образование простагландинов [142, 209]. Показано, что ЭПО стимулирует поглощение ионов кальция в системе эритроидных клеток, на более дифференцированных стадиях вызывает значительное повышение концентрации свободного кальция [218, 252].

Кроме пери- и тубулярных клеток почек, ЭПО может синтезироваться нейронами, клетками микроглии, гепатоцитами и другими клетками [146]. Мозговой ЭПО имеет малый размер и менее активен *in vitro* в низких концентрациях в отличие от рекомбинантного ЭПО, что обусловлено различием в их сиаировании [119]. Выработку мозгового ЭПО может стимулировать не только гипоксия, но и другие метаболические нарушения (гипогликемия, изменения деполяризации нейронов), которые приводят к нарушениям в митохондриях клетки через активацию фактора индукции гипоксии (HIF-1) [125, 303]. Экспрессия м-РНК ЭПО в клетках микроглии может стимулироваться инсулином и фактором синтеза инсулина [211].

Наличие рецепторов для ЭПО на нейронах определяет его новые биологические эффекты [100, 233]. В частности, ЭПО регулирует эмбриональное развитие головного мозга, способствует улучшению когнитивной функции [212]. Стимулами для продукции ЭПО выступают не только гипоксия, но и активные формы кислорода при активации прооксидантных систем, снижении антиокислительной защиты в клетках, дефиците селена, инсулин, инсулиноподобный фактор роста, ИЛ-1, ИЛ-6, TNF- α , 17 β -эстрадиол и др. [204]. Установлено позитивное влияние ЭПО на психофизиологический статус, функциональное состояние вегетативной нервной системы у больных с терминальной ХПН, находящихся на заместительной почечной терапии [53, 54, 55].

Показано, что структура рецептора для ЭПО на неэритроидных клетках отличается от рецептора на клетках-предшественницах эритроцитов, а для его активации требуются наномолярные концентрации ЭПО, что снижает вероятность перекрестных эффектов ЭПО на эндокринном и паракринном

уровнях. Полученные данные позволяют рассматривать локальную систему ЭПО–рецептор ЭПО как звено неспецифической защиты при повреждении, а рецепторы ЭПО на неэритроидных клетках обозначаются как защищающие ткань рецепторы. Такие рецепторы по структуре являются гетеродимером, состоящим из субъединиц рецептора ЭПО и β CR (общий рецептор β , CD131), последний также представлен в составе рецепторов для ГМ-КСФ, ИЛ-3, ИЛ-5 [217, 221, 225].

На различных моделях заболеваний в экспериментах показано, что ЭПО играет нейротрофическую и нейропротективную роль, в частности при церебральной ишемии [30, 89, 90, 91, 258, 278]. ЭПО выполняет функции нейротрансммиттера, обеспечивая синаптическую пластичность в головном мозге взрослых людей, способствует восстановлению нервной ткани в эксперименте [117, 143, 293]. Длительное лечение ЭПО улучшает моторную функцию мотонейронов и астроцитов, активирует микроглию в цервикальном канале спинного мозга у мышей с экспериментальной моделью бокового амиотрофического склероза [124]. В экспериментальных исследованиях по применению ЭПО в моделях ишемии головного мозга показано увеличение 30-дневной выживаемости животных до 56% [145].

Таким образом, результаты приведенных исследований свидетельствуют о перспективности изучения эффективности применения ЭПО при различных заболеваниях нервной системы в экспериментальных и клинических условиях.

1.5 Механизм влияния лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона на биологические ткани

Результаты исследований особенностей взаимодействия лазерного излучения с биологическими тканями послужили основой для формирования нового направления – лазерной медицины. Существует ряд отличительных признаков лазерного излучения по сравнению со световой энергией других источников [40, 66, 88]:

1) излучение является монохроматическим, т. е. излучается в очень узком диапазоне длин волн;

2) излучение является сильно коллимированным, т. е. все лучи в пучке почти параллельны друг другу и на большом расстоянии лазерный пучок лишь незначительно увеличивается в диаметре;

3) излучение является когерентным, т. е. световые колебания взаимно согласованы в разных точках пространства и/или времени;

4) излучение, как правило, имеет высокую степень поляризации, т. е. в случае плоскополяризованной волны вектор напряженности электрического поля колеблется в одной плоскости, оставаясь перпендикулярным к направлению распространения волны.

Применение лазерного излучения в медицине основано на использовании разнообразных физико-химических эффектов, связанных с взаимодействием света с биологическими тканями и клеточными элементами. Известные процессы подразделяются на фотохимическое взаимодействие, термические и нелинейные взаимодействия.

Фотохимические процессы доминируют при низкой плотности мощности (мощности излучения, падающей на единицу облучаемой поверхности) и продолжительном времени экспозиции; термические процессы – при более высокой плотности мощности и более коротком времени воздействия; нелинейные процессы – при воздействии плотности мощности более 10 Вт/см^2 с ультракоротким временем облучения (наносекунды и менее). Преобладающий характер воздействия зависит от свойств лазерного излучения (длина волны, мощность, длительность облучения и частота повторения импульсов) и от свойств биологического материала (оптических, термических), на что указывают ряд авторов [27, 32, 66, 97, 98].

При лазерном воздействии на биологические ткани могут наблюдаться следующие процессы: отражение, поглощение и/или пропускание. Причем в зависимости от длины волны падающего излучения отражается до 60% последнего. Наиболее важным эффектом является поглощение излучения в

биологических тканях, которое зависит от неомогенности структуры ткани и длины волны лазерного излучения. Так, излучение дальней инфракрасной области, в которую входит излучение с длиной волны 2,9 мкм Er:YAG-лазера и 10,6 мкм CO₂-лазера, имеет глубину проникновения от 1 до 20 мкм [66]. Поглощение зависит от содержания в биологических тканях специфических поглотителей, в частности, в инфракрасном диапазоне существенное значение имеет содержание воды, в ультрафиолетовом диапазоне – содержание протеинов.

Поглощенная энергия лазерного излучения оказывает термическое действие на биологические ткани, вызывая в облученном объеме локальное повышение температуры. Если не происходит фазовых переходов (преобразование твердых составных частей в жидкость или газ, испарение жидкостей), то температура повышается пропорционально плотности энергии. Часть тепла отводится путем теплопроводности в более холодный участок окружающей ткани или через кровоток. Таким образом, термические свойства живой ткани определяются в основном тремя процессами: теплопроводностью, накоплением тепла и отводом его кровеносной системой [66, 98].

В диапазоне длин волн от 600 до 1 200 нм лазерное излучение слабо поглощается биологическими тканями («окно прозрачности»), преобладает рассеяние. При этом глубина проникновения (ослабление мощности) составляет от 2 до 8 мм, а терапевтически значимые дозы могут быть достигнуты на глубине до 2,5–3 см. Излучение лазеров в этом диапазоне длин волн используется для лазерной терапии [39, 66, 77, 85, 166].

Термин «лазерная терапия» фактически объединяет несколько методов:

- 1) поверхностное облучение при лечении ран, заболеваний кожи и слизистых;
- 2) воздействие на глубоколежащие органы при облучении кожи в проекции органа;
- 3) внутривенное и надвенозное облучение крови;
- 4) лазерная акупунктура.

В настоящее время в большей степени используются лазеры с длиной волны 800–1000 нм и высокой мощностью лазерного излучения. Первоначально в качестве терапевтического средства использовались маломощные He-Ne-лазеры (длина волны 633 нм, мощность 5–25 мВт) [38, 46]. Они применялись для внутривенного облучения крови и воздействия на акупунктурные точки. Появление мощных и достаточно дешевых (доступных) лазерных диодов привело к созданию современных физиотерапевтических аппаратов. Параллельно шло развитие аппаратуры для лазерной хирургии и фотодинамической терапии, в которой используются лазерные диоды преимущественно того же интервала длин волн, но большей мощности [45]. В настоящее время кроме традиционной низкоинтенсивной лазерной терапии разрабатываются методики среднеинтенсивной и высокоинтенсивной лазерной терапии для воздействия на крупные мышцы и суставы. В запатентованной методике HILT (high-intensity laser therapy) используется импульсный Nd:YAG-лазер с длиной волны 1 064 нм, средней мощностью 6 Вт и мощностью в импульсе до 1 кВт [95, 115, 138, 140].

Вопрос о параметрах лазерного излучения, оптимальных для проведения лазерной терапии, остается до конца не изученным. Выбор оптимальной длины волны должен определяется первичным хромофором-поглотителем лазерного излучения. Для его выявления используют определение спектров действия лазерного излучения на культуры клеток при определенных условиях. Предполагается, что первичным акцептором может быть молекулярный кислород [29]. Было показано, что под влиянием лазерного излучения увеличивалась эластичность мембраны эритроцитов, при этом максимумы соответствуют длинам волн 587, 639, 762 и 1 264 нм, что совпадает с полосами поглощения молекулярного кислорода, растворенного в воде. Другим универсальным акцептором лазерного излучения может быть фермент цитохром-с-оксидаза в митохондриях. В работах Т. Й. Кару с соавторами было показано, что максимумы активации процессов в клетках при длинах волн 620, 680, 760 и 820 нм совпадают со спектром поглощения этого терминального фермента дыхательной цепи [35, 181, 182, 235]. Акцептором лазерного излучения в красной области спектра могут

служить эндогенные порфирины [36, 44, 215]. Поскольку при воздействии на организм в целом не обнаружено пиковых зависимостей биологического действия лазерного излучения от длины волны, возможно, первичным акцептором лазерного излучения может являться любой подходящий хромофор. Поглощение кванта света вызывает локальный перегрев клеточных структур, что приводит к разжижению цитоплазмы, переходу ее из состояния цитогеля в цитозоль, повышению концентрации внутриклеточного кальция и запуску широкого спектра кальций-зависимых процессов, которые и определяют стимулирующее действие лазерного облучения [47, 48].

Результатом последующего каскада биохимических реакций является активация ферментов дыхательной цепи, изменение ионной проницаемости и деформируемости мембран клеток, активизация репликации митохондриальной ДНК, запуск кальций-зависимых процессов, экспрессия факторов роста, пролиферация клеток, изменение уровней оксида азота [29, 36, 65, 129, 181, 222]. Показано, что лазерная терапия стимулирует ангиогенез, способствует восстановлению функции сердца после инфаркта миокарда, вызывает выход стволовых клеток из костного мозга в кровеносное русло, увеличение синтеза АТФ [129, 173, 191, 274, 294].

Зависимость стимулирующего действия лазерного излучения от дозы также носит нелинейный характер [19, 20, 79]. При этом для достижения терапевтически значимых мощностей и доз в глубине следует учитывать поглощение в вышележащих слоях ткани. Так, было показано, что излучение длиной волны 800 нм при поверхностной плотности мощности 700 мВт/см^2 уменьшается при прохождении через кости черепа до 40,10% у мыши, до 21,24% у крысы, до 11,36% у кролика и до 4,18% у человека, что важно для проведения транскраниальной лазерной терапии [192, 193, 194].

Различные формы низкоинтенсивной лазерной терапии (внутривенное и надвенное облучение крови, транскраниальная лазерная терапия, лазерная акупунктура) разрабатываются и применяются при ишемическом инсульте в нашей стране и за рубежом. При этом считается, что терапевтический эффект

лазерной терапии у больных ишемическим инсультом обусловлен повышением сродства гемоглобина к кислороду, что приводит к ресинтезу АТФ и восстановлению энергетического метаболизма тканей головного мозга, поврежденных при гипоксии/реперфузии [49, 268]. Под действием лазерного излучения происходит перестройка белковых полимеров (изменяется активность ферментов, структурно-функциональных свойств клеточных мембран, активируется фибринолиз и уменьшается вязкость крови, стимулируются ферментные системы эритроцитов), что приводит к увеличению кислородной емкости крови. Результатом курса лазеротерапии является улучшение функционального состояния микроциркуляции и ликворного дренирования, тканевого транспорта и метаболизма головного мозга, что повышает темпы нейропластических процессов в ЦНС [87, 244]. Уменьшение неврологического дефицита после инсульта при применении лазерной терапии было прямо показано в экспериментах на животных, при этом наблюдались гистохимические признаки пролиферации и миграции нейронов. Выраженный эффект наблюдался и при раннем применении лазерной терапии, и при начале лечения после 24 часов с момента инсульта [232, 297].

В серии работ, проводимых в ГБУЗ ЦОСМП «Челябинский государственный институт лазерной хирургии» (с 2016 года – ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины»), было показано, что лазерное воздействие в терапевтических режимах повышенной мощности (полупроводниковый лазер с длиной волны 970 нм, 1–5 Вт дистанционно) на зоны локализации костного мозга вызывает выход в кровеносное русло клеток-предшественников, стимулирует улучшение микроциркуляции и образование новых кровеносных сосудов, уменьшает ишемию в миокарде и периферических тканях при дистальном поражении сосудов нижних конечностей. Это происходит за счет увеличения экспрессии в тканях фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), наиболее выраженной в эндотелиальных клетках мелких кровеносных сосудов [16, 17, 18, 19, 20, 65, 78, 79].

Известна роль VEGF в усилении пролиферативной активности, дифференцировки и способности к миграции эндотелиальных клеток, что способствует формированию в тканях нового сосудистого русла и уменьшению ишемии, в том числе при ишемии головного мозга [139, 153, 254, 279, 306]. Следовательно, повышение экспрессии в тканях фактора роста сосудистого эндотелия можно считать универсальной основой процесса неоангиогенеза, проявляющегося после лазерного воздействия на ишемизированные ткани [16].

В настоящее время ведутся исследования по применению транскраниальной лазерной терапии как в эксперименте, так и в клинической практике [87, 166, 174, 189, 191, 222, 232, 267, 307]. В том числе разрабатываются методики лазерной терапии повышенной мощности излучения [166, 222]. Результаты лечения обнадеживающие, но недостаточно воспроизводимые. Так, в клинических исследованиях NEST-1, 2, 3 на третьем этапе не было продемонстрировано статистически значимых различий между группой, в которой проводилась лазерная терапия в первые сутки после инсульта, и плацебо-контролем, хотя результаты первых двух этапов были обнадеживающими [174, 189, 267, 307, 308].

Таким образом, применение лазерного излучения для лечения ишемии головного мозга является перспективным, но недостаточно изученным вопросом.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Работа выполнена на 200 нелинейных половозрелых крысах обоего пола массой 220–250 граммов. Животные содержались в условиях вивария, регламентируемых приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 г. Опыты с животными проводились в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETSIN 123, 18 марта 1986 г.), включая приложение А от 15.06.2006 г., с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22.09.2010 г. Все оперативные вмешательства проводились в экспериментальной операционной с соблюдением правил асептики и антисептики под общей анестезией препаратом «Золетил» (Virbac Sante Animale, Франция; 20 мг/кг).

Все животные были разделены на 5 групп (таблица 1). Исследования в каждой группе проводились на 3, 7, 14, 30 сутки. Выбор сроков исследования определялся тем, что они позволяют отследить клинические проявления острой фокальной церебральной ишемии в динамике, а также наиболее характерные клеточные реакции в зоне ишемии головного мозга.

Первая группа (ложнооперированные животные). После внутримышечного введения препарата «Золетил» и введения животного в наркоз волосяной покров в области операции сбривали до гладкой кожи, обрабатывали 70% этиловым спиртом. Производили разрез мягких тканей головы в проекции сагиттального шва в промежутке между лобно-теменным и теменно-затылочным швами длиной до 2 см. Мягкие ткани разводили и фиксировали ранорасширителем. Кость скелетировали. Высокооборотным бором в левой теменной области наносили трепанационное отверстие до 3 мм в диаметре до

Таблица 1

Дизайн исследования

Группы животных	Схема введения ЭПО	Параметры лазерного излучения	Сутки исследования	Кол-во животных	Методы исследования
1. Ложнооперированные	Препарат не вводился	Облучение не проводилось	3, 7, 14, 30	40	Неврологические, этологические, доплер-флуориметрия, 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 ч, 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 ч, в/брюшинно	«ИРЭ-Полюс», 970 нм, 1 Вт, 2 мин, непр., дистанционно	3, 7, 14, 30	40	
Итого				200	

твёрдой мозговой оболочки, его расширяли до 7 мм в диаметре зажимом типа «москит». Рану зашивали непрерывным швом.

Вторая группа представлена крысами, у которых моделировали фокальную ишемию коры головного мозга (ИКГМ) по методике, описанной Chen S. T. [127, 69]. После трепанации черепа, техника которой описана в первой группе животных, вскрывали крестообразно твёрдую мозговую оболочку. С помощью биполярного электрокоагулятора под бинокулярной лупой (х3,5, «ЛОМО», Россия) для достижения полной перманентной фокальной ишемии производили диатермокоагуляцию пиальных сосудов поверхности коры головного мозга по периметру трепанационного отверстия в области задних отделов левой лобной доли и передних отделов левой теменной доли головного мозга (прецентральные и постцентральные извилины левого полушария головного мозга). Выбор области ИКГМ определялся тем, что задние отделы левой лобной доли и передние отделы левой теменной доли являются наиболее функционально значимыми для реализации двигательной и чувствительной функций животных, а также тем, что источником кровоснабжения коры головного мозга в области пре- и постцентральных извилин являются преимущественно корковые ветви средней мозговой артерии, которая чаще всего поражается при ишемических инсультах головного мозга у людей.

У **третьей группы** животных моделировали ИКГМ по методике, описанной выше у второй группы животных, и вводили внутрибрюшинно через 3, 24, 48 часов после индукции ИКГМ рекомбинантный эритропоэтин («Эпокрин 2000 МЕ», ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург) из расчёта 5 000 МЕ на 1 кг массы животного. Суммарная доза введенного ЭПО составила 15 000 МЕ/кг.

У **четвертой группы** животных моделировали ИКГМ по методике, описанной выше у второй группы животных, и через 2 часа после индукции ИКГМ однократно воздействовали на область ишемического очага лазерным излучением с длиной волны 970 нм. Для этого использовали лазерный хирургический аппарат «ИРЭ-Полус» (ООО НТО «ИРЭ-Полус», Россия).

Облучение проводилось дистанционно с расстояния 2–3 см от поверхности операционного поля в непрерывном режиме мощностью 1 Вт в течение 2 минут. Доставка лазерного излучения производилась через моноволоконный световод диаметром 0,6 мм с плоским торцом.

У **пятой группы** животных моделировали ИКГМ по методике, описанной выше у второй группы животных, и через 2 часа после индукции ИКГМ проводили дистанционное накожное облучение диодным лазером, как описано в группе 4. Через 3 часа после индукции ИКГМ (т. е. через час после воздействия лазером), через 24 и 48 часов животным внутрибрюшинно трехкратно вводили рекомбинантный эритропоэтин в суммарной дозе 15 000 МЕ/кг, как описано в группе 3.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Оценка неврологического статуса животных

Для оценки неврологического статуса при экспериментальной ИКГМ использовали шкалу Garcia J. H. [150]. Данный тест позволяет оценивать следующие параметры, характеризующие поведенческую активность животных, двигательную функцию, чувствительную функцию, стато-координаторную функцию.

1. Спонтанная активность. Животное наблюдали в течение 5 минут в условиях его нахождения в клетке. Активность крысы оценивали по способности приближаться ко всем четырем бортам клетки. Критерии оценки: 3 балла – животное свободно перемещалось, исследовало окружающее пространство и приближалось как минимум к трем бортам клетки; 2 балла – крыса перемещалась по клетке, не могла приближаться ко всем бортам клетки, но достигала хотя бы одного из них, движения неуверенные; 1 балл – значительные поражения в двигательной сфере: крыса не могла подняться, приближаться к бортам клетки,

незначительно перемещалась в горизонтальном положении; 0 баллов – животное не двигалось.

2. Симметричность в движении всех конечностей. Животное держали в подвешенном состоянии за хвост для оценки симметрии в движении конечностей. Критерии оценки: 3 балла – все 4 конечности растянуты симметрично; 2 балла – конечности на правой стороне удлинялись в меньшей степени или медленнее, чем на левой; 1 балл – минимальные движения в правых конечностях; 0 баллов – отсутствие движений в правой передней конечности. Оценивались движения в правых конечностях, так как при поражении левого полушария головного мозга (левой лобной доли и передних отделов левой теменной доли) отмечаются его признаки на контрлатеральной (правой) стороне.

3. Симметричность в движениях передних конечностей при движении вперед. Держа за хвост, животное помещали к поверхности стола и ставили на передние лапы. Симметричность при движении вперед на обеих передних конечностях оценивалась, когда крыса передними конечностями достигала поверхности стола, а задние конечности удерживались в воздухе. Критерии оценки: 3 балла – обе передние лапы вытянуты и крыса идет симметрично на передних конечностях; 2 балла – правая передняя конечность вытянута в меньшей степени, чем левая, что ведет к нарушению ходьбы на передних конечностях; 1 балл – отмечаются минимальные движения в правой передней конечности; 0 баллов – нет движений в правой передней конечности.

4. Способность забираться по стенке клетки. Крысу помещали к стенке проволочной клетки. Обычно крыса использует все четыре конечности, чтобы подняться вверх по стенке проволочной клетки. При снятии крысы с проволочной клетки за хвост крыса сопротивляется. Критерии оценки: 3 балла – крыса легко поднимается по проволочной стенке и крепко закрепляется за прутья всеми конечностями; 2 балла – конечности на правой стороне ослаблены во время подъема и не оказывают такого же сопротивления, как на левой стороне, при снятии животного с проволочной стенки; 1 балл – животное не может подняться по стенке или ходит по кругу вместо подъема по проволочной стенке.

5. Оценка проприоцептивной чувствительности. Определяется реакция на прикосновение тупой деревянной палочкой к каждой стороне туловища. Критерии оценки: 3 балла – при прикосновении палочки с обеих сторон туловища животного крыса одинаково реагирует путем поворота головы в сторону прикосновения; 2 балла – замедленная реакция крысы поворотом головы на прикосновения с правой стороны по сравнению с левой; 1 балл – нет реакции животного на прикосновение с правой стороны.

6. Ответ на прикосновение к вибриссам. Тупой деревянной палочкой воздействовали на вибриссы с каждой стороны. При этом палочка была расположена сзади от вибриссов животного во избежание попадания в поле зрения крысы. Критерии оценки: 3 балла – крыса одинаково реагировала на раздражитель с обеих сторон; 2 балла – замедленная реакция на раздражитель с правой стороны; 1 балл – нет реакции на раздражитель с правой стороны.

Для интегральной оценки неврологического статуса каждого животного подсчитывали сумму всех шести оцениваемых параметров. Минимальное количество баллов по сумме признаков (3 балла) характеризуется как выраженный неврологический дефицит, максимальное количество баллов (18 баллов) свидетельствует об отсутствии неврологического дефицита.

2.2.2 Оценка поведения животных в актографе «открытое поле»

Проводится для оценки поведения животных в незнакомых условиях. Метод заключается в исследовании двигательного компонента ориентировочной реакции и эмоциональной реактивности животных [81, 92].

Актограф представляет собой квадратный манеж 80x80 см, дно которого разбито на 16 квадратов. В центре каждого квадрата имеется отверстие диаметром 3,8 см для выявления исследовательской активности у животных. Исследуемое животное помещали в актограф в угловой квадрат. Каждое животное тестировалось 1 раз. Время наблюдения составляло 10 минут. Регистрировали следующие показатели: количество переходов животных по 16 квадратам

рассматривалось как мера локомоции – горизонтальная активность (ГА), число подъемов на задние лапы являлось критерием ориентировочной реакции – вертикальная активность (ВА), количество выглядываний через отверстие отражало исследовательскую активность (ИА), число фекальных болюсов (ФБ) свидетельствовало о вегетативных последствиях эмоционального стресса, вызванного помещением животного в незнакомую обстановку, количество актов груминга (ГР). Поведенческие и вегетативные реакции животных регистрировали с помощью цифровой видеокамеры HP HD 2300 (Китай). Полученные данные обрабатывали математически с использованием компьютерной программы RealTimer (ООО «НПК Открытая Наука», Россия).

2.2.3 Оценка микроциркуляции в интактных и ишемизированных тканях коры головного мозга методом лазерной доплеровской флуориметрии

Оценка микроциркуляции у животных производилась на 3, 7, 14 и 30 сутки эксперимента с использованием прибора ЛАКК-01 (Россия) на основе инфракрасного лазера с помощью трехканального светового зонда, смонтированного из кварцевых моноволоконных световодов. Показатели снимались через трепанационное отверстие с помощью датчика, приложенного к месту операции. Время записи лазерной доплеровской флуоригаммы составляло 5 минут. Математическая и статистическая обработка показателей прибора осуществлялась с помощью комплекта программ ООО «Лазма» (Россия). Определяли показатель микроциркуляции (ПМ), который является функцией от усредненной скорости эритроцитов (V_{cp}) и концентрации эритроцитов в зондируемом объеме тканей ($N_{эр}$), зависящей от показателя гематокрита и количества функционирующих сосудов: $ПМ = N_{эр} + V_{cp}$. Величина показателя микроциркуляции измерялась в относительных перфузионных единицах (пф. ед.).

2.2.4 Гематологические методы исследования

Для оценки гематологических показателей использовали автоматический гематологический анализатор для ветеринарии BC-2800 Vet (Mindray, Китай). Образец цельной крови подносился к пробозаборнику прибора для забора 13 мкл крови. В анализаторе используются 2 независимых друг от друга принципа измерения: 1) метод Coulter для определения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов; 2) колориметрический метод для определения гемоглобина. Оценивали следующие гематологические показатели:

- абсолютное количество лейкоцитов (WBC), $\cdot 10^9/\text{л}$;
- абсолютное количество лимфоцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$;
- абсолютное количество гранулоцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$;
- абсолютное количество моноцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$;
- количество эритроцитов (RBC), $\cdot 10^{12}/\text{л}$;
- гемоглобин (HGB), г/л;
- гематокрит (HCT), %;
- средний объем эритроцита (MCV), фл;
- среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг;
- средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/дл;
- количество тромбоцитов (PLT), $\cdot 10^9/\text{л}$.

2.2.5 Определение концентрации эритропоэтина

Концентрацию эритропоэтина в сыворотке крови определяли с помощью автоматического иммуноферментного анализатора PersonalLAB (Италия) с применением специфической тест-системы для крыс фирмы Cloud-Clone Corp (США). Результаты выражали в пг/мл.

2.2.6 Морфологические и иммуногистохимические методы исследования

После выведения животных из эксперимента головной мозг извлекали и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Серийные срезы головного мозга окрашивали гематоксилином и эозином по методу М. Бильшовского, В. Шпильмейера для выявления миелиновых волокон, по методу Ф. Ниссля – для определения тигроидного вещества Ниссля, глиальных клеток [15]. На условной единице площади среза подсчитывали при увеличении $\times 400$ количество интактных нейронов, количество нейронов с хроматолизом, количество клеток-теней, количество глиоцитов и количество мелких кровеносных сосудов. Микроскопическое изучение гистологических срезов проводили на микроскопе Leica DMRXA (Германия). Морфометрическое исследование площади ишемического очага в головном мозге проводили при увеличении $\times 200$ с помощью планиметрической линейки, результат выражали в мкм^2 . Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерной программы анализа изображений Image Scope M (Россия, Москва).

Оценку экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в ткани головного мозга проводили иммуногистохимическим методом с использованием набора первичных специфических для крыс антител к VEGF (клон SP 28, тип Rabbit, SpringBio) и высокоадгезивные стекла с положительно заряженной поверхностью (SuperFrostPlus). Срезы высушивали в течение 12 часов при температуре 37°C на термостойке. Все этапы иммуногистохимической реакции проводились в автоматическом режиме на иммуногистостейнере BenchMarkXT (Ventana, USA) с соблюдением протокола исследования. Для визуализации применяли универсальную систему UltraVIEWUniversalDAB (Ventana, USA) – комплекс с вторичными антителами и хромоген DAB. Докрашивание препаратов проводили Hematoxylin 2 (Ventana, USA). После проведения реакции срезы подвергали дегидратации и помещали под покрывное стекло. Подсчитывали при увеличении $\times 400$ количество клеток с цитоплазматической экспрессией VEGF от

светло- до темно-коричневого окрашивания на условной единице площади ткани мозга в 10 случайно отобранных полях зрения.

2.2.7 Статистические методы исследования

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 19. Показатели обрабатывались методами описательной статистики и представлены в виде медианы (Me) и квартилей [Q₁-Q₃]. Значимость различий между группами животных оценивали при помощи непараметрического критерия Крускала–Уолиса. Для сравнения двух независимых групп по одному количественному признаку использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Анализ динамики изученных показателей в процессе лечения осуществляли с помощью критерия Фридмана (в случае более двух зависимых выборок) и парного критерия Вилкоксона (в случае двух зависимых выборок). Если значение p было меньше 0,001, то p указывали в формате $p < 0,001$. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Морфофункциональные изменения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

При экспериментальной фокальной ишемии головного мозга нами проведена оценка неврологического и этологического статуса, микроциркуляции в очаге ишемии коры головного мозга, количественного состава клеток в крови и сопряженных гематологических показателей, концентрации ЭПО в сыворотке крови, а также морфологическая и морфометрическая оценка в ишемизированной ткани коры головного мозга с определением экспрессии в очаге ишемии антител к фактору роста сосудистого эндотелия (VEGF).

3.1.1 Морфологическая верификация и экспрессия VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Для верификации поражений нервной ткани при выбранной модели ишемии коры головного мозга у крыс, вызванной диатермокоагуляцией пиальных сосудов в области пре- и постцентральных извилин левого полушария головного мозга, использовали морфологические методы. Гистологическое исследование препаратов головного мозга животных (n=5) через 2 часа после моделирования ишемии показало, что дистрофические и некротические изменения нервной ткани захватывали область коры головного мозга (рисунок 1А).

При исследовании гистологических препаратов головного мозга в динамике ИКГМ на 7 сутки эксперимента в местах коагуляции пиальных сосудов определялись некроз стенки сосудов, мелкоочаговые кровоизлияния и отек в периваскулярной и перицеллюлярной ткани (рисунок 1Б), регистрировались

дистрофия и некроз клеточных элементов. Нейроциты теряли большую часть набухших отростков, вытягивались, приобретая угловатую форму, глыбки хроматина в нейроцитах исчезали, цитоплазма их бледно окрашивалась тионином, ядра клеток сморщивались, окрашивались тионином в темно-синий цвет. Отмечалось острое набухание и лизис клеточных элементов с образованием клеток с признаками сморщивания и склероза (клеток-теней) (рисунки 2А, 2Б, 2В). Реакция нейроглии заключалась в утолщении, фрагментации и распаде астроцитов, набухании их тел и отростков и постепенном превращении астроцитов в амёбовидные клетки; определялись набухание и дистрофические изменения микроглии (рисунок 3А). Миелиновые волокна коры и белого вещества головного мозга находились в состоянии набухания и вакуолизации слоя миелина, а в нервных волокнах отмечалась фрагментация с последующим зернистым и глыбчатым распадом (рисунок 3Б).

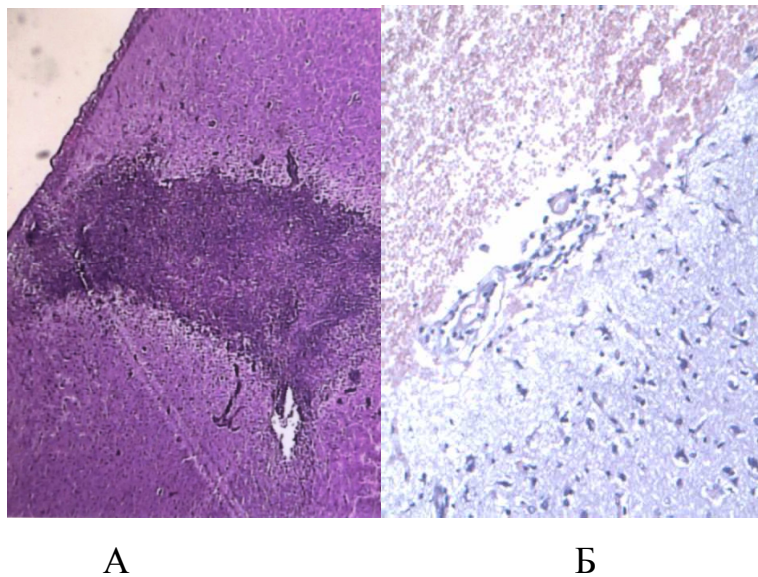


Рисунок 1 – Морфологические изменения в очаге ишемического повреждения головного мозга: А – очаг некроза в коре головного мозга через 2 часа после ИКГМ (окраска гематоксилином и эозином, ув. х50); Б – некроз стенки сосудов, кровоизлияние, периваскулярный и перицеллюлярный отек в зоне коагуляции пилальных сосудов на 7 сутки после ИКГМ (окраска гематоксилином и эозином, ув. х200)

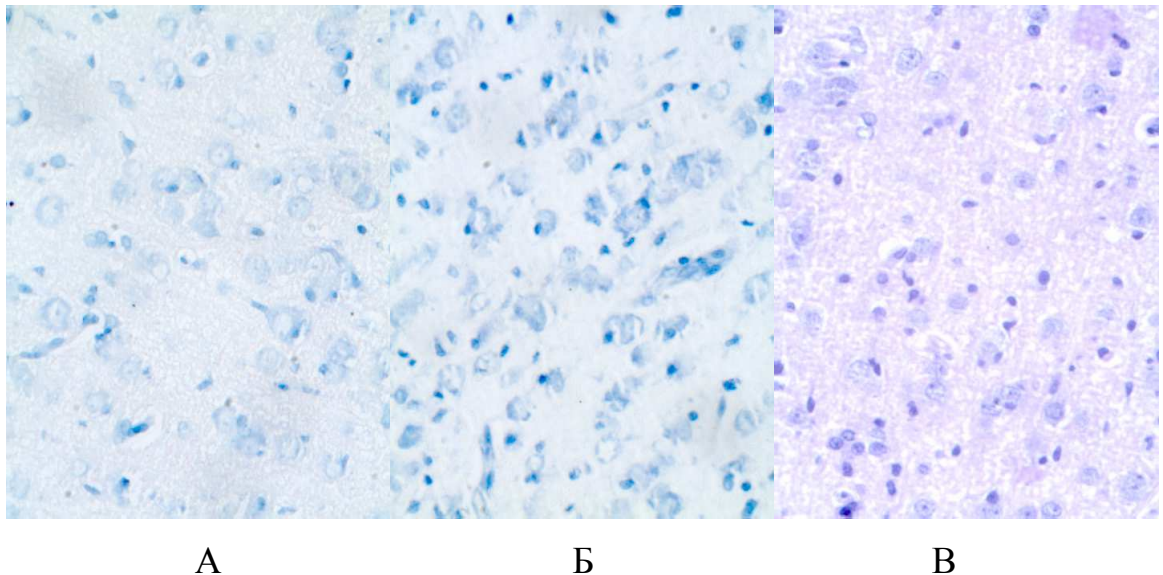


Рисунок 2 – Морфологические изменения в очаге ишемического повреждения головного мозга на 7 сутки эксперимента:
А – исчезновение глыбок хроматина в нейронах с бледноокрашенной цитоплазмой (окраска тионином по Нисслю, ув. х400); Б – сморщенные ядра нейроцитов темно-синего цвета (окраска тионином по Нисслю, ув. х400); В – острое набухание и лизис клеточных элементов с образованием клеточ-теней (окраска тионином по Нисслю, ув. х400)

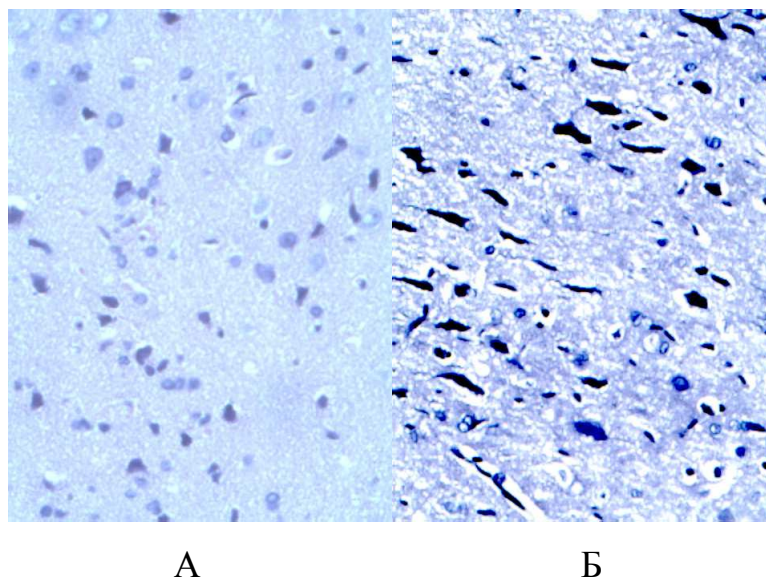


Рисунок 3 – Морфологические изменения в очаге ишемического повреждения головного мозга на 7 сутки эксперимента:
А – фрагментация и распад астроцитов с превращением в амёбовидные клетки (окраска гематоксилином и эозином, ув. х400); Б – набухание и вакуолизация слоя миелина в нервных волокнах с их фрагментацией и глыбчатым распадом (окраска по Шпильмейеру, ув. х400)

Результаты микроскопического исследования гистологических препаратов головного мозга на 14 сутки ИКГМ показали, что в зоне коагуляции пиальных сосудов распространенность некроза и кровоизлияний несколько уменьшилась, здесь отмечалась активизация глиальных макрофагов (рисунок 4А). В окружающей ткани мозга по-прежнему отмечались дистрофические и некротические изменения в нейронах, явления перичеллюлярного и периваскулярного отека, встречались клетки-тени, амёбовидные астроциты (рисунок 4Б), набухшие и вакуолизированные миелиновые волокна. На 30 сутки после ИКГМ в местах коагуляции пиальных сосудов сформировались глиосоединительнотканые рубцы (рисунок 4В).

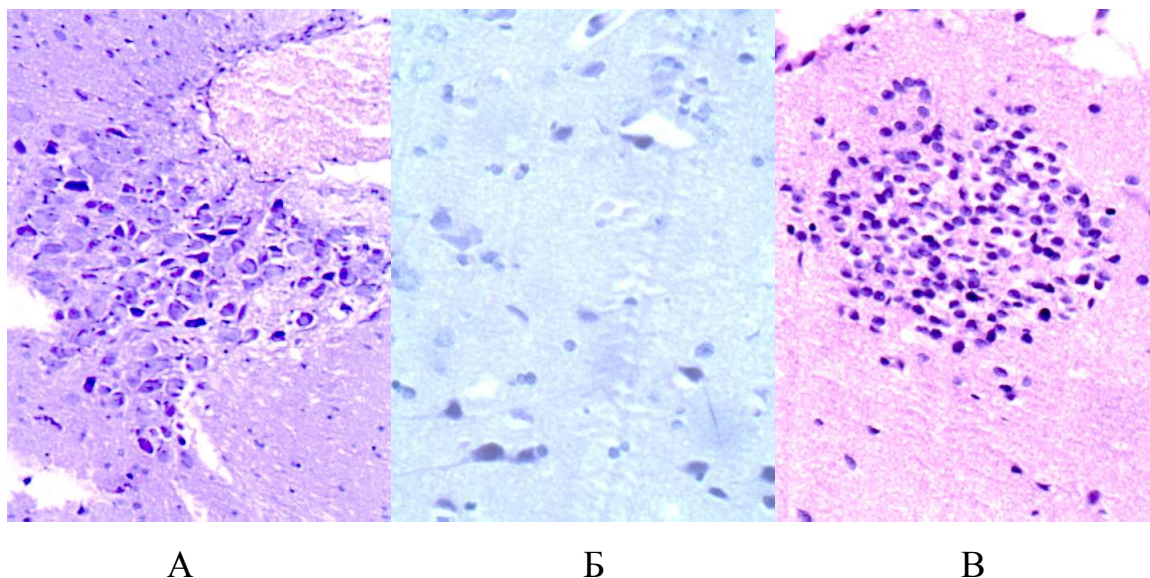


Рисунок 4 – морфологические изменения в очаге ишемического повреждения головного мозга: А – некроз и кровоизлияния в мозговом веществе, глиальные макрофаги в зоне коагуляции пиальных сосудов на 14 сутки после ИКГМ (окраска гематоксилином и эозином, ув. х200); Б – дистрофия и некроз нейроцитов, клетки-тени, амёбовидные астроциты, перичеллюлярный отек на 14 сутки после ИКГМ (окраска гематоксилином и эозином, ув. х400); В – сформированный глиосоединительнотканый рубец на 30 сутки после ИКГМ (окраска гематоксилином и эозином, ув. х400)

Результаты количественного исследования гистологических препаратов головного мозга представлены в таблице 2. Количество интактных нейронов на условной единице площади (1 мм^2) достоверно снижалось на 3, 7, 14 и 30 сутки

Таблица 2

Морфометрические показатели в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 1. Л/опериров. (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 1. Л/опериров. (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 1. Л/опериров. (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 1. Л/опериров. (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)
ИН, ед./мм ²	190,53 [189,67- 192,6]	40,47 [37,25- 46,54] *	190,92 [189,23- 194,19]	36,50 [30,87- 42,77] *	191,18 [189,30- 194,13]	30,38 [23,08- 36,39] *	191,14 [187,17- 194,44]	25,21 [15,96- 32,29] *
НХр, ед./мм ²	0	36,44 [31,96- 38,11]*	0	25,94 [25,21- 26,73] *	0	34,10 [32,03- 35,09] *	0	42,10 [40,45- 43,10] *
КТ, ед./мм ²	0	56,74 [51,69- 60,03] *	0	62,25 [58,08- 66,84] *	0	70,75 [67,04- 72,68] *	0	76,35 [70,77- 78,01] *
Гл, ед./мм ²	136,93 [130,43- 139,68]	123,55 [115,20- 138,16]	137,79 [132,34- 139,64]	119,45 [115,54- 125,13]	135,47 [131,56- 140,59]	133,53 [130,48- 136,89]	135,74 [133,36- 138,17]	120,03 [117,96- 123,62]
МС, ед./мм ²	14,88 [13,65- 16,07]	5,27 [4,43- 5,55] *	14,80 [13,31-15,67]	7,13 [6,41- 7,87] *	15,54 [14,08-16,70]	8,84 [7,73- 10,14] *	14,88 [14,16-15,54]	14,26 [11,93-16,01]
ПИ, мкм ²	0	557,13 [541,38- 582,23]	0	604,06 [593,48- 625,80]	0	734,66 [718,89- 744,00]	0	994,65 [968,38- 995,85]

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 1; ИН – интактные нейроны, НХр – нейроны с хроматолизом, КТ – клетки-тени, Гл – глиоциты, МС – мелкие сосуды, ПИ – площадь инфаркта.

после ИКГМ по сравнению с группой ложнооперированных животных. В динамике ИКГМ на 7 и 14 сутки на правах тенденции, а на 30 сутки статистически значимо ($p < 0,01$) снижалось количество интактных нейронов по сравнению с 3 сутками эксперимента. На 3, 7, 14 и 30 сутки после ИКГМ в очаге повреждения визуализировались нейроны с хроматолизом и клетки-тени, их представительство на 7 и 14 сутки эксперимента снижалось по сравнению с 3 сутками, а на 30 сутки эксперимента вновь увеличивалось по сравнению с 7 сутками после ИКГМ. Количество глиоцитов в очаге ишемического повреждения головного мозга статистически значимо не изменялось на 3, 7, 14 и 30 сутки по сравнению с группой ложнооперированных животных, а также в динамике ИКГМ.

Значительные изменения зафиксированы в количестве мелких кровеносных сосудов в очаге повреждения после моделирования ИКГМ: их представительство снижалось на 3, 7, 14 сутки эксперимента и восстанавливалось до значений в группе ложнооперированных животных на 30 сутки эксперимента. Площадь инфаркта в динамике ИКГМ увеличивалась на 7 сутки – на 8,4% по сравнению с 3 сутками, на 14 сутки – на 31,8% ($p < 0,01$) по сравнению с 3 сутками, на 30 сутки – на 78,5% ($p < 0,01$) по сравнению с 3 сутками. Расширение зоны повреждения в динамике ИКГМ обеспечивается широким спектром патогенетических механизмов.

Полагаем, что увеличение площади инфаркта на 3–7 сутки ИКГМ обусловлено неспецифическими (снижение энергетического обеспечения, повреждение мембран и ферментов, дисбаланс ионов и воды в клетках, изменение экспрессии генов и дизрегуляция функций клеток) и специфическими механизмами повреждения нейронов [37]. Последние включают звенья «ишемического каскада» в области пенумбры («ишемической полутени»): в условиях относительного, а затем абсолютного энергетического дефицита нейронов нарушается функция ионных АТФаз, утрачивается калий-натриевый градиент, накапливается кальций в клетке, что сопряжено с гипергидратацией, снижением возбудимости, активацией глутаматных рецепторов NMDA.

На следующем этапе «ишемического каскада» ключевыми звеньями патогенеза выступают глутаматная эксайтотоксичность, прогрессирующее накопление Ca^{2+} в нейронах, активация кальмодулин-зависимых протеинкиназ, мембранных фосфолипаз, эндонуклеаз, разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях, накопление жирных кислот и повышение детергентной активности цитозоля нейронов, активация свободнорадикальных процессов, приводящие в совокупности к гибели нейронов путем апоптоза и некроза.

На более поздних этапах после ИКГМ (14–30 сутки), когда в очаге повреждения увеличивается количество мелких сосудов, восстанавливается кровоток, ведущим механизмом расширения зоны инфаркта в рамках синдрома церебральной ишемии–реперфузии становится оксидативный стресс, а источниками свободных радикалов выступают сами нейроны (нейрональная NO-синтаза), глиоциты, а позднее – нейтрофилы крови, поступающие в очаг в условиях повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера, поврежденного свободными радикалами, цитокинами, медиаторами воспаления. Повышение ГЭБ обеспечивает воздействие на нервную ткань накопившегося в период ишемии широкого спектра цитотоксических веществ – продуктов метаболизма, ионов, ферментов и др. Следует учитывать в отношении эскалации оксидативного стресса при ИКГМ низкое содержание в тканях мозга антиоксидантов (прежде всего, витамина А), низкую активность ферментов антиоксидантной защиты и высокое содержание двухвалентного железа. Наряду с указанными, на поздних этапах ИКГМ имеют значение в увеличении площади инфаркта процессы локального воспаления, аутоиммунной реакции, расстройства микроциркуляции из-за дисрегуляции тонуса сосудов, эндотелиальной дисфункции и как следствие нарушение трофической и регенераторной функции нервной ткани.

Таким образом, морфологические исследования в области ишемии коры головного мозга у крыс зафиксировали признаки ишемического повреждения нервной ткани. Полученные данные согласуются с результатами других

исследований по изучению динамики морфологических изменений в ткани головного мозга после ишемического инсульта [28, 31, 282].

При оценке экспрессии VEGF в группе животных с экспериментальной ИКГМ в очаге ишемии отмечено увеличение данного показателя с 3 суток эксперимента (на 59% по медиане по сравнению с группой ложнооперированных животных), которое сохраняется на 7 сутки (увеличение на 105%), 14 сутки (увеличение на 200%), 30 суток эксперимента (увеличение на 295%) (таблица 3).

Таблица 3

**Экспрессия VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ
(Me [Q1-Q3], количество клеток / у.е. площади)**

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	8,50 [7,00; 9,00]	9,50 [8,00; 10,00]	10,00 [8,75; 11,25]	10,00 [10,00; 12,00]
2. ИКГМ	13,50 [12,75; 15,0]	19,50 [18,0; 20,25]	30,00 [28,75; 31,00]	39,50 [38,00; 41,25]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$

Отмечены значимые ($p < 0,01$) различия между экспрессией VEGF при ИКГМ на 7 сутки по сравнению с 3 сутками, на 14 сутки по сравнению с 3 и 7 сутками, на 30 сутки по сравнению с 3, 7, 14 сутками наблюдения. Обнаруженные изменения экспрессии VEGF являются отражением фокальной ишемии головного мозга и нарушения целостности ГЭБ [102]. Принято считать, что повышение экспрессии VEGF в ишемизированной ткани является одним из основных компенсаторных механизмов на повреждающее воздействие в ткани головного мозга [176].

Известно, что в условиях гипоксии снижается активность супрессорного фактора фон Гиппеля-Линдау (VHL, von Hippel-Lindau factor) – компонента убиквитин протеинлигазы – и тем самым повышается экспрессия индуцируемого

гипоксией фактора транскрипции (HIF-1 alpha). Таргентными генами HIF-1 alpha выступают в том числе гены VEGF, PECAM-1, эритропоэтина, гемоксигеназы-1 и др., их продукты играют ключевую роль в процессах нейрорепарации, ангиогенеза, нейротрофики после инсульта [183, 184]. Отметим, что VEGF и ЭПО являются продуктами одного пути активации генов HIF-1 alpha, что может указывать на их функциональную синергичность при ишемических поражениях головного мозга.

Повышение экспрессии VEGF является пусковым фактором для активации неоангиогенеза в очаге ишемии коры головного мозга. При проведении корреляционного анализа между количеством мелких сосудов в очаге ишемического повреждения и экспрессией VEGF нами установлена прямая слабая связь на 3 сутки ИКГМ (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,31$; $p<0,05$), на 7 сутки ИКГМ (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,36$; $p<0,05$), средней силы связь на 14 сутки ИКГМ (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,58$; $p<0,05$), на 30 сутки ИКГМ (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,50$; $p<0,05$).

На следующем этапе работы оценивали неврологические показатели, микроциркуляцию в очаге повреждения и гематологические показатели при экспериментальной ИКГМ.

3.1.2 Неврологический и этологический статус крыс при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Для оценки неврологического статуса при экспериментальной ИКГМ использовали шкалу Garcia J. H. [150]. Применение этого теста позволяет оценивать следующие параметры, характеризующие поведенческую активность животных, двигательную, чувствительную, стато-координаторную функцию:

- 1) спонтанная активность в клетке за 5 мин;
- 2) симметричность вытягивания передних конечностей;
- 3) симметричность движений;

- 4) способность забираться по стенке проволочной клетки;
- 5) реакция на прикосновение к каждой стороне туловища;
- 6) ответ на прикосновение к вибриссам.

Минимальное количество баллов по сумме признаков (3 балла) характеризуется как выраженный неврологический дефицит, максимальное количество баллов (18 баллов) свидетельствует об отсутствии неврологического дефицита.

В группе животных с ИКГМ развиваются поведенческие нарушения и очаговый неврологический дефицит в виде двигательных, чувствительных и стато-координаторных расстройств, которые неполностью регрессируют к 30 суткам эксперимента (таблица 4). Отметим, что в группе животных с ИКГМ наблюдался правосторонний гемипарез, атаксия, сопровождавшиеся гиподинамией, заторможенностью по сравнению с группой ложнооперированных животных. На 3 сутки ИКГМ интегральный показатель неврологического статуса, оцениваемый по шкале Garcia J. H., по медиане статистически значимо снижается в 3 раза по сравнению с группой ложнооперированных животных, на 7 сутки – в 2 раза, на 14 сутки – на 33,4%, на 30 сутки – на 16,7 %.

Таблица 4

**Неврологический статус при экспериментальной ИКГМ,
оцениваемый по шкале Garcia J. H. (Me [Q1-Q3])**

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	18 [17,00-18,00]	18 [18,00-18,00]	18 [18,00-18,00]	18 [18,00-18,00]
2. ИКГМ	6 [5,00-7,25]	9 [8,00-10,5]	12 [11,0-13,0]	15 [14,0-16,25]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$

Как видно, полного восстановления неврологического статуса к 30 суткам эксперимента в группе животных с ИКГМ не наблюдается, сохраняются

статистически значимые различия с группой ложнооперированных животных. Однако обнаружены значимые изменения неврологического дефицита у животных в динамике ИКГМ: на 14 сутки по сравнению с 3 сутками ($p < 0,01$), на 30 сутки по сравнению с 3 сутками ($p < 0,01$) и 7 сутками ($p < 0,01$), что позволяет констатировать частичное восстановление неврологического статуса начиная с 14 суток эксперимента. Для анализа поведенческой активности экспериментальных животных применялся тест «открытое поле». Использование теста «открытое поле» является общепринятым в нейроэтологических исследованиях при экспериментальном инсульте [198]. Тест проводится с целью изучения поведения животных в новых для них условиях. При этом оценивается ориентировочно-исследовательское поведение по горизонтальной и вертикальной активности, числу выглядываний через отверстие; уровень эмоционально-поведенческой активности животного – по числу фекальных болюсов, количеству актов груминга [10, 81, 240].

При проведении теста «открытое поле» на 3, 7, 14, 30 сутки отмечается статистически значимое снижение ориентировочно-исследовательской активности животных с экспериментальной ИКГМ по сравнению с группой ложнооперированных животных (таблица 5). Так, на 3 сутки горизонтальная активность животных с ИКГМ уменьшается на 64% по сравнению группой ложнооперированных животных; вертикальная активность уменьшается на 50%; исследовательская активность уменьшается на 73,3% по сравнению с группой ложнооперированных животных. На 7 сутки горизонтальная активность животных с ИКГМ уменьшается на 31,44% по сравнению группой ложнооперированных животных; вертикальная активность уменьшается на 57,1%; исследовательская активность уменьшается на 42,9% по сравнению с группой ложнооперированных животных. На 14 сутки горизонтальная активность, вертикальная активность и исследовательская активность животных с ИКГМ уменьшаются на 57,9% по сравнению группой ложнооперированных животных. На 30 сутки горизонтальная активность животных с ИКГМ уменьшается на 47,5% по сравнению группой ложнооперированных животных; вертикальная активность

уменьшается на 41,2%; исследовательская активность уменьшается на 50% по сравнению с группой ложнооперированных животных. Совокупное снижение горизонтальной, вертикальной и исследовательской активности говорит об угнетении ориентировочно-исследовательского поведения на всех сроках наблюдения после ИКГМ [42].

Не отмечено статистически значимой разницы изменения уровня эмоционально-поведенческой активности животных, презентруемого по показателям количества фекальных болюсов и количества актов груминга, в группе с экспериментальной ИКГМ по сравнению с группой ложнооперированных животных на всех сроках наблюдения. С одной стороны, груминг можно отнести к форме обычного поведения грызунов, с другой стороны, снижение актов груминга можно оценить как один из поведенческих маркеров при действии стрессовых факторов [34]. Однако по изменению только количества актов груминга сложно оценить эмоционально-поведенческую активность животных.

Таким образом, ориентировочно-исследовательское поведение животных в группе с экспериментальной ИКГМ угнетается на всех сроках наблюдения по сравнению с группой ложнооперированных животных.

Патогенез обнаруженных изменений связан со снижением кровотока в коре головного мозга в области кровоснабжения средней мозговой артерии, что в конечном итоге приводит к развитию инфаркта головного мозга. В частности, область кровоснабжения средней мозговой артерии включает сенсомоторную зону коры головного мозга, состоящей из нейронов прецентральной извилины, отвечающей за двигательную функцию, и постцентральной извилины, отвечающей за чувствительность. Ишемия в левой сенсомоторной зоне коры головного мозга приводит к двигательным и чувствительным расстройствам на контрлатеральной стороне.

Таблица 5

Показатели теста «открытое поле» при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 1. Л/опериров. (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 1. Л/опериров. (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 1. Л/опериров. (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 1. Л/опериров. (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)
ГА, актов	18,5 [17,75; 22,0]	7,0 [6,0; 8,0] *	17,5 [16,5; 18,75]	12,0 [11,5; 12,75]*	19,0 [18,0; 20,0]	8,0 [7,75; 8,75] *	20,0 [18,25; 20,5]	10,5 [8,75; 11,25] *
ВА, актов	8,0 [7,0; 9,0]	4,0 [3,0; 5,0] *	7,0 [6,0; 8,0]	3,0 [1,75; 4,0] *	7,0 [6,0; 8,0]	3,0 [2,75; 4,25] *	8,5 [8,0; 9,0]	5,0 [4,75; 6,0] *
ИА, актов	7,5 [6,75; 8,25]	2,0 [2,0; 3,0] *	7,0 [6,0; 7,25]	4,0 [3,75; 5,0] *	7,0 [6,0; 8,0]	3,0 [3,0; 4,0] *	8,0 [8,0; 9,0]	4,0 [3,0; 5,0] *
Гр, актов	3,0 [2; 3,25]	1,0 [1,0; 2,0]	2,5 [1,75; 3,0]	2,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,0]	1,5 [1,0; 2,0]	3,0 [2,0; 4,0]	2,0 [1,0; 2,25]
ФБ, кол-во	2,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [0,75; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 3,0]	1,0 [0,0; 1,0]	1,0 [1,0; 2,0]

Примечание: * – значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1; ГА – горизонтальная активность, ВА – вертикальная активность, ИА – исследовательская активность, Гр – груминг, ФБ – фекальные болюсы.

Снижение кровотока в области кровоснабжения средней мозговой артерии ведет к снижению доставки кислорода в нервную ткань, что в свою очередь приводит к энергетическому дефициту, электролитному дисбалансу и снижению синтеза веществ. Активация гликолиза частично компенсирует дефицит АТФ, но инициирует лактат-ацидоз и цитотоксический отек нейронов. Прогрессирование гипоксии приводит к полному энергетическому дефициту и избыточному высвобождению глутамата и аспартата, запуску глутамат-кальциевого каскада и поступлению ионов Ca^{2+} внутрь клетки через агонист-зависимые кальциевые каналы, контролируемые активируемыми глутаматом и аспартатом рецепторами. Накопление Ca^{2+} внутри нейронов приводит к деполяризации клеточных мембран и гибели клеток, формирующих «ядро» ишемии инфаркта головного мозга в зоне повреждения.

3.1.3 Оценка микроциркуляции в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Для оценки микроциркуляции применялся прибор «ЛАКК-01» (Россия) на основе инфракрасного лазера, показатели снимали через трепанационное отверстие с помощью датчика в течение 5 минут. Определялся показатель микроциркуляции в относительных перфузионных единицах (пф. ед.), который является функцией от усредненной скорости эритроцитов (V ср) и концентрации эритроцитов в зондируемом объеме тканей (N эр), зависящей от показателя гематокрита и количества функционирующих сосудов. Результаты представлены в таблице 6.

В группе животных с ИКГМ при исследовании микроциркуляции на 3 сутки отмечается значительное снижение кровотока по сравнению с группой ложнооперированных животных (на 55% по медиане), которое сохраняется на 7 сутки (снижение на 48% по медиане), 14 сутки (снижение на 50% по медиане), 30 сутки (снижение на 27,6% по медиане).

**Показатель микроциркуляции при экспериментальной ИКГМ
(Me [Q1-Q3], пф. ед.)**

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	5,19 [4,54-6,95]	5,29 [4,87-6,95]	5,19 [4,57-6,95]	5,21 [4,53-6,95]
2. ИКГМ	2,34 [1,61-3,86]	2,75 [0,89-3,87]	2,57 [1,36-5,48]	3,77 [2,93-4,38]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2}=0,001$	$P_{1-2}=0,001$	$P_{1-2}=0,016$	$P_{1-2}=0,001$

Как видно, начиная с 7 суток эксперимента отмечается тенденция к увеличению показателя микроциркуляции. На 30 сутки в группе животных с ИКГМ показатель микроциркуляции статистически значимо повышается ($p<0,01$) по сравнению с 3, 7 и 14 сутками.

Полученные результаты связаны со снижением кровотока в корковых артериях в области экспериментальной ИКГМ. При этом снижается количество и замедляется кровоток в мелких кровеносных сосудах в зоне ишемии на ранних сроках ишемии с постепенным увеличением скорости кровотока в динамике ишемии на более поздних сроках. Последний факт отражает обнаруженные ранее морфологические изменения в ткани мозга в области ишемии: увеличение количества мелких кровеносных сосудов, ассоциированное с повышением экспрессии VEGF.

3.1.4 Гематологические показатели и концентрация эритропоэтина в крови при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Для оценки гематологических показателей у крыс при экспериментальной ИКГМ использован гематологический анализатор для ветеринарии, откалиброванный для крыс. В литературе представлены скудные сведения об

изменении количественного состава клеток в крови и эритроцитарных индексов при ишемических поражениях головного мозга, большая часть публикаций посвящена оценке биохимического профиля, а именно исследованию липидограммы и риска атерогенеза, гемостазиограммы и риска тромботических осложнений, что вполне обоснованно с клинических позиций при планировании терапевтических и профилактических мероприятий у данной категории больных.

Результаты исследования гематологических показателей представлены в динамике экспериментальной ИКГМ в таблицах 7 и 8. На 3 сутки эксперимента зафиксировано увеличение в крови общего количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов. Количество тромбоцитов в крови значимо не изменяется. При оценке показателей «красной крови» обнаружено снижение количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, без изменения эритроцитарных индексов – среднего объема эритроцитов, среднего содержания гемоглобина в эритроците, средней концентрации гемоглобина в эритроцитах. Обнаруженные изменения позволяют говорить о нормоцитарной, нормохромной анемии. Отметим, что указанные показатели количества эритроцитов и гематокрита снижаются не только относительно группы ложнооперированных животных, но и выходят за границы референсных значений [86].

На 7 сутки после индукции ИКГМ у крыс сохраняется увеличение в крови общего количества лейкоцитов, количества нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов. Количество тромбоцитов в крови значимо не изменяется. Количество эритроцитов, гемоглобина и гематокрита также сохраняется сниженным, наряду с этим снижаются среднее содержание гемоглобина в эритроците и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах при отсутствии значимых изменений показателя среднего объема эритроцитов, что позволяет констатировать гипохромную, нормоцитарную анемию.

Таблица 7

Гематологические показатели при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 1. Л/опериров. (n=5)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 1. Л/опериров. (n=5)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 1. Л/опериров. (n=5)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 1. Л/опериров. (n=5)	Группа 2. ИКГМ (n=5)
WBC, 10 ⁹ /л	9,52 [9,04-10,32]	16,27 [13,37-24,08] *	8,01 [7,62-9,47]	28,45 [19,64-31,42] *	7,24 [6,11-8,35]	12,53 [11,22-16,75] *	7,11 [6,37-7,95]	8,88 [8,02-11,46] *
Neu, 10 ⁹ /л	1,31 [1,02-1,59]	3,05 [2,53-8,27] *	1,19 [0,97-1,43]	4,74 [3,95-6,22] *	1,05 [0,92-1,24]	2,41 [1,91-2,92] *	1,09 [0,92-1,24]	1,92 [1,38-2,77]
Lymph, 10 ⁹ /л	7,88 [7,32-8,60]	12,37 [12,01-17,62] *	6,52 [4,26-7,24]	22,98 [18,34-29,92] *	5,89 [4,75-6,78]	9,81 [8,21-14,02] *	6,02 [5,52-6,99]	6,67 [5,21-8,94]
Mon, 10 ⁹ /л	0,24 [0,21-0,27]	0,51 [0,46-0,99] *	0,33 [0,11-0,49]	0,47 [0,46-0,99] *	0,27 [0,18-0,43]	0,41 [0,29-0,68]	0,18 [0,14-0,25]	0,31 [0,20-0,41]
PLT, 10 ⁹ /л	676 [644-699]	596 [554-672]	629 [621-638]	622 [595-654]	652 [614-682]	641 [605-682]	677 [651-698]	651 [583-697]

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 1; WBC – лейкоциты, Neu – нейтрофилы, Lymph – лимфоциты, Mon – моноциты, PLT – тромбоциты.

Таблица 8

Гематологические показатели при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 1. Л/опериров (n=5)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 1. Л/опериров. (n=5)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 1. Л/опериров. (n=5)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 1. Л/опериров. (n=5)	Группа 2. ИКГМ (n=5)
RBC, 10 ¹² /л	8,13 [7,78-8,22]	5,59 [4,12-7,01] *	8,42 [7,92-8,53]	5,95 [5,21-6,74] *	8,12 [7,72-8,23]	8,44 [7,81-8,97]	8,54 [8,02-8,93]	9,02 [8,33-9,79]
HGB, г/л	153,4 [144,2-162,4]	130,7 [121,2-155,1] *	161,3 [151,2-174,2]	123,2 [121,0-127,3] *	155,1 [149,8-168,1]	155,7 [151,0-157,3]	165,1 [151,2-172,5]	162,1 [155,6-167,8]
HCT, %	47,3 [44,8-48,2]	35,2 [33,5-42,1] *	48,9 [46,2-51,3]	40,1 [38,2-46,7] *	46,7 [45,8-50,2]	47,8 [44,2-49,7]	47,9 [45,8-50,2]	49,0 [46,1-50,7]
MCV, фл	57,18 [56,40-68,25]	62,96 [57,13-72,0]	58,21 [57,22-61,69]	63,19 [57,83-74,39]	57,81 [57,25-61,68]	55,72 [50,81-61,11]	55,94 [54,26-61,64]	53,95 [52,01-58,81]
MCH, пг	18,22 [16,41-18,63]	22,51 [19,04-23,97]	19,41 [19,16-20,92]	18,47 [15,22-19,88] *	18,89 [17,11-20,97]	18,04 [17,42-21,53]	19,06 [18,14-20,97]	18,29 [18,02-22,31]
MCHC, г/дл	30,55 [30,47-33,25]	35,13 [31,87-37,92]	32,71 [31,16-33,91]	29,13 [26,15-31,72] *	33,01 [31,12-33,95]	32,52 [30,41-33,21]	34,94 [31,72-36,25]	32,99 [29,73-35,89]

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 1; RBC – эритроциты, HGB – гемоглобин, HCT – гематокрит, MCV – средний объем эритроцита, MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците.

На 14 сутки экспериментальной ИКГМ наблюдается, как и ранее, увеличение в крови общего количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов. Количество тромбоцитов в крови значимо не изменяется. Количество эритроцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит, эритроцитарные индексы не имеют статистически значимых отличий с группой ложнооперированных животных. На 30 сутки эксперимента обнаружено только увеличение в крови общего количества лейкоцитов без значимых изменений популяционного состава лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, гематокрита и эритроцитарных индексов.

Итак, при экспериментальной ИКГМ у крыс на 3, 7, 14 сутки наблюдается лейкоцитоз за счет увеличения количества нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, на 3 и 7 сутки снижается количество эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, на 7 сутки снижается среднее содержание гемоглобина в эритроците и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах.

Отметим, что в динамике экспериментальной ИКГМ в крови общее количество лейкоцитов, количество нейтрофилов, количество лимфоцитов на 7 сутки статистически значимо выше, чем на 3 сутки, а на 14 сутки – ниже, чем на 3 и 7 сутки. Таким образом, выраженность лейкоцитоза при ИКГМ максимальна на 7 сутки эксперимента.

Полагаем, что обнаруженные гематологические изменения связаны с ключевыми событиями в очаге повреждения при ИКГМ [178]. Так, лейкоцитоз является отражением реакции миелоидного и лимфоидного ростков костного мозга на синтез медиаторов воспаления в очаге, их источником могут быть глиоциты, эндотелиоциты. На ранних этапах (3 сутки) увеличение количества лейкоцитов может быть связано с демаргинацией и выходом пристеночного пула в кровоток, миграцией зрелых клеток из костномозгового пула. Позднее (7 сутки) лейкоцитоз обусловлен активацией миелоидного и лимфоидного ростков костного мозга. Системная воспалительная реакция, разворачивающаяся при инсульте, является фактором риска неблагоприятного исхода и ухудшения неврологического дефицита [283, 296]. Ряд противовоспалительных фармакологических агентов, в частности блокаторы адгезии лейкоцитов,

оказались успешными при экспериментальном инсульте, однако их применение ограничено в клинических условиях [106, 301].

Патогенез анемии при экспериментальной ИКГМ, по всей видимости, является многофакторным и по большому счету отражает воспалительные реакции в очаге ишемии. Повышение концентрации провоспалительных цитокинов, в том числе ТНФ-альфа, ИЛ-1, ИФН-гамма и др., угнетает эритропоэз как напрямую, так и через снижение синтеза эритропоэтина в почках. Активация резидентных макрофагов печени, селезенки, костного мозга приводит к захвату циркулирующих эритроцитов и усилению гемолиза. Еще один механизм может быть связан с нарушением метаболизма железа. Провоспалительные цитокины, активируя синтез гепсидина в печени, приводят к блокаде белка ферропортина в кишечнике и макрофагах, что соответственно угнетает поступление трансферрина в кровь из энтероцитов, угнетая таким образом всасывание железа и выход трансферрина из макрофагов для повторного использования железа в организме. Полагаем, что на начальных этапах ИКГМ (3 сутки) анемия преимущественно обусловлена усилением гемолиза, позднее (7 сутки) – угнетением эритропоэза и нарушением метаболизма железа.

Нами проведена оценка концентрации эритропоэтина в крови при экспериментальной ИКГМ. Результаты представлены в таблице 9. Как видно, на 3 сутки зафиксировано статистически значимое снижение концентрации ЭПО в среднем на 22% относительно группы ложнооперированных животных. На 7, 14, 30 сутки эксперимента концентрация ЭПО в крови значимо не изменялась. По всей видимости, гипозритропоэтинемия является отражением описанных выше изменений (снижения синтеза ЭПО в почках в условиях повышения концентрации провоспалительных цитокинов в крови) и вносит вклад в формирование анемии при ИКГМ.

По данным литературы, как лейкоцитоз, так и анемия являются прогностически неблагоприятными факторами при инсульте [101, 160, 180, 206, 291]. Показано, что анемия более чем в три раза увеличивает риск смерти после перенесенного инсульта. У больных с инсультом патогенез анемии может быть

многофакторным и включать нарушение обмена железа, синтез про- и противовоспалительных цитокинов и дисрегуляцию эритропоэза, нарушение функции почек, потерю крови и др. В эпидемиологическом исследовании Chang Y. L. et al. на 204 372 пациентах убедительно продемонстрирована связь между анемией и ишемическими инсультами, но не обнаружено связи между анемией и субарахноидальным/внутричерепным кровоизлиянием [126]. Мета-анализ 6 исследований с участием 3 810 больных с ишемическим инсультом показал, что анемия является независимым предиктором смерти [160]. При этом многие исследователи подчеркивают отсутствие четких подходов в лечении анемии при цереброваскулярных заболеваниях.

Таблица 9

Концентрация эритропоэтина в сыворотке при экспериментальной ИКГМ (Me [Q1-Q3], пг/мл)

Группа 1. Ложно- оперированные (n=5)	Группа 2. ИКГМ 3 сутки (n=5)	Группа 2. ИКГМ 7 сутки (n=5)	Группа 2. ИКГМ 14 сутки (n=5)	Группа 2. ИКГМ 30 сутки (n=5)
2155,3 [1561,7- 2286,1]	1681,6 [1223,1- 2186,1] *	2005,2 [1322,2- 2579,8]	2358,1 [1737,2- 2964,8]	2137,6 [1683,5- 3435,1]
Примечание: * – значимые ($p<0,01$) различия с группой 1.				

Снижение кислородобеспечения нейронов является одним из ведущих факторов формирования области пенумбры и расширения зоны ишемического повреждения. Снижение концентрации ЭПО, как было отмечено выше, вносит определенный вклад в формирование анемии при ИКГМ. По всей видимости, экзогенное введение ЭПО в этом отношении за счет стимуляции эритропоэза позволит увеличить доставку кислорода в головной мозг.

Нами проведен корреляционный анализ между показателями неврологического статуса (сумма баллов по шкале Garcia J. H.) и количеством эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, нейтрофилов в крови при ИКГМ.

Установлена прямая средней силы связь между показателем неврологического статуса и количеством эритроцитов и концентрацией гемоглобина в крови на 3 сутки (соответственно $R=0,52$; $R=0,54$; $p<0,01$), 7 сутки (соответственно $R=0,61$; $R=0,65$; $p<0,01$). Выявлена обратная сильная связь между показателем неврологического статуса и количеством лейкоцитов и количеством нейтрофилов в крови на 3 сутки (соответственно $R= - 0,75$; $R= - 0,81$; $p<0,01$), 7 сутки (соответственно $R= - 0,83$; $R= - 0,86$; $p<0,01$).

Учитывая вышесказанное, а также участие ЭПО в метаболизме нервной ткани, его потенциальные антиоксидантные, антиапоптогенные свойства, участие в неоангиогенезе, патогенетически обоснованным может быть применение экзогенного ЭПО при ИКГМ. Кроме этого, обнаруженные ранее иммуномодулирующие, в том числе противовоспалительные, эффекты ЭПО при термической травме, хронической почечной недостаточности могут являться предпосылкой для применения ЭПО не только с целью коррекции анемии, нейропротекции, но и регуляции воспалительных реакций [54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63].

Выводы по разделу 3.1

1. В динамике экспериментальной ИКГМ в очаге повреждения наблюдаются дистрофия и некроз нейронов и нейроглии, образование клеток-теней и амебовидных астроцитов, фрагментация и распад миелиновых волокон, формирование глиосоединительнотканного рубца, что сопровождается от 3 к 30 суткам эксперимента снижением количества интактных нейронов, мелких сосудов, появлением нейронов с хроматолизом, появлением и увеличением количества клеток-теней, площади инфаркта, повышением экспрессии VEGF. В динамике экспериментальной ИКГМ количество мелких сосудов в очаге ишемического повреждения ассоциировано с экспрессией VEGF.

2. При экспериментальной ИКГМ на всех сроках наблюдения фиксируется очаговый неврологический дефицит в виде двигательных, чувствительных и статико-координаторных расстройств, угнетается ориентировочно-

исследовательская активность животных; снижается микроциркуляция в очаге ИКГМ, показатель частично восстанавливается к 30 суткам эксперимента.

3. При экспериментальной ИКГМ у крыс на 3, 7, 14 сутки наблюдается лейкоцитоз за счет увеличения количества нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, на 3 и 7 сутки снижается количество эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, на 7 сутки снижается среднее содержание гемоглобина в эритроците и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах. На 3 сутки ИКГМ снижается концентрация ЭПО в крови. Установлена ассоциация между показателем неврологического статуса по шкале Garcia J. H. и количеством эритроцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, концентрацией гемоглобина в крови.

3.2 Нейропротекторные аспекты применения эритропоэтина при экспериментальной ишемии коры головного мозга

3.2.1 Влияние эритропоэтина на неврологический и этологический статус крыс при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Для оценки нейропротекторного эффекта системного применения ЭПО при ИКГМ на первом этапе исследовали клиническую картину на 3, 7, 14, 30 сутки по показателям неврологического статуса и этологического статуса.

При исследовании неврологического статуса у крыс по шкале Garcia J. H. выявлено, что на 3 сутки наблюдения интегральный показатель статистически значимо увеличивался на 3, 7, 14 сутки наблюдения и не отличался на 30 сутки от значений в группе животных с ИКГМ. Прирост интегрального показателя на 3 сутки составил по медиане 67%, на 7 сутки – 50%, на 14 сутки – 25% относительно группы животных с ИКГМ. Отметим, что, несмотря на увеличение интегрального показателя, он не достигал значений в группе ложнооперированных животных на 3 и 7 сутки наблюдения. Таким образом, максимальный эффект ЭПО на неврологический статус у крыс наблюдается на 3 и

7 сутки ИКГМ, а на 14 и 30 сутки фиксируется восстановление неврологического статуса (таблица 10).

Таблица 10

Влияние эритропоэтина на неврологический статус при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3], баллы)

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	18 [17,00-18,00]	18 [18,00-18,00]	18 [18,00-18,00]	18 [18,00-18,00]
2. ИКГМ	6 [5,00-7,25]	9 [8,00-10,5]	12 [11,0-13,0]	15 [14,0-16,25]
3. ИКГМ + ЭПО	10 [9,50-11]	13,5 [12-15]	15 [13,75-16,25]	17 [15,75-18,0]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-3} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-3} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$

При изучении поведенческой активности крыс с ИКГМ в условиях применения ЭПО в тесте «открытое поле» получены результаты, представленные в таблице 11. На 3 сутки эксперимента установлено только статистически значимое повышение горизонтальной активности животных, вертикальная активность и исследовательская активность возрастали на правах тенденции, количество актов груминга и фекальных болюсов значимо не изменялось. На 7 сутки наблюдения при ИКГМ в условиях применения ЭПО увеличивалась горизонтальная активность (на 17% по медиане), вертикальная активность (на 133% по медиане) и исследовательская активность животных (на 50% по медиане). На 14 сутки экспериментальной ИКГМ у крыс возрастала горизонтальная активность (на 81% по медиане), вертикальная активность (на 150% по медиане) и исследовательская активность животных (на 100% по медиане). Аналогичные по направленности изменений результаты получены

Таблица 11

Влияние эритропоэтина на показатели теста «открытое поле» при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)
ГА, актов	7,0 [6,0; 8,0]	12,5 [11,0; 13,25] *	12,0 [11,5; 12,75]	14,0 [13,0; 14,5] *	8,0 [7,75; 8,75]	14,5 [13,0; 14,5] *	10,5 [8,75; 11,25]	16,5 [15,75; 17,0] *
ВА, актов	4,0 [3,0; 5,0]	5,0 [4,0; 5,25]	3,0 [1,75; 4,0]	7,0 [6,0; 7,0] *	3,0 [2,75; 4,25]	7,5 [6,0; 8,25] *	5,0 [4,75; 6,0]	8,5 [8,0; 9,0] *
ИА, актов	2,0 [2,0; 3,0]	4,0 [3,0; 4,0]	4,0 [3,75; 5,0]	6,0 [5,0; 7,0] *	3,0 [3,0; 4,0]	6,0 [5,75; 6,25] *	4,0 [3,0; 5,0]	8,0 [7,0; 9,0] *
Гр, актов	1,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,5; 2,0]	1,5 [1,0; 2,0]	2,0 [1,75; 2,0]	2,0 [1,0; 2,25]	3,0 [3,0; 4,0]
ФБ, кол-во	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [0,75; 2,0]	2,0 [1,0; 3,0]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	0,5 [0,0; 1,0]
Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 2; ГА – горизонтальная активность, ВА – вертикальная активность, ИА – исследовательская активность, Гр – груминг, ФБ – фекальные болюсы.								

на 30 сутки наблюдения: увеличение горизонтальной активности (на 57% по медиане), вертикальной активности (на 70% по медиане) и исследовательской активности животных (на 100% по медиане). Отметим, что на 3, 7 и 14 сутки эксперимента наблюдались достоверные отличия показателей горизонтальной активности, вертикальной активности и исследовательской активности по сравнению с группой ложнооперированных животных, а на 30 сутки значимых отличий не наблюдалось. Таким образом, в условиях применения ЭПО при экспериментальной ИКГМ зафиксировано на 3, 7 и 14 сутки частичное, а на 30 сутки полное восстановление ориентировочно-исследовательской активности животных.

Итак, в условиях применения ЭПО при экспериментальной ИКГМ на всех сроках наблюдения (3, 7, 14, 30 сутки) установлен различной степени выраженности эффект на показатели неврологического статуса и этологического статуса. В условиях применения ЭПО интегральный показатель неврологического статуса, оцениваемый по шкале Garcia J. H., восстанавливается к 14 суткам наблюдения, а показатели этологического статуса (ориентировочно-исследовательское поведение) восстанавливаются к 30 суткам наблюдения.

ЭПО в настоящее время в РФ не входит в перечень терапевтических мероприятий для лечения больных с инсультами. Однако в литературе за последние 10 лет накоплено значительное количество сведений о положительном эффекте применения ЭПО при экспериментальных поражениях ЦНС сосудистого, инфекционного, травматического, аутоиммунного генеза, а также роли ЭПО в восстановлении когнитивных функций у больных с хронической почечной недостаточностью, находящихся на заместительной терапии [53, 55, 117, 120, 186, 187, 219, 224, 303].

Механизм обнаруженного нейропротекторного действия ЭПО может быть многофакторным. Прежде всего, учитывая, что ведущим механизмом нарушения неврологического статуса при ИКГМ (двигательных, чувствительных и стато-координаторных расстройств) является ограничение кровотока в коре головного мозга в области кровоснабжения средней мозговой артерии (пре- и

постцентральная извилина), необходимо отметить возможность ЭПО стимулировать неоангиогенез и тем самым улучшать кислородообеспечение нейронов. В связи с чем на следующем этапе работы исследовали влияние ЭПО на показатель микроциркуляции в очаге ишемического повреждения в динамике экспериментальной ИКГМ.

3.2.2 Влияние эритропоэтина на микроциркуляцию в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Установлено, что в условиях применения ЭПО показатель микроциркуляции статистически значимо не изменяется на 3 и 7 сутки экспериментальной ИКГМ, несмотря на определенную тенденцию к увеличению (таблица 12). На 14 сутки показатель микроциркуляции значимо возрастает (на 107% по медиане относительно группы животных с ИКГМ). На 30 сутки эксперимента показатель микроциркуляции статистически значимо возрастает на 53%. Отметим, что в динамике экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО показатель микроциркуляции статистически значимо ($p < 0,05$) возрастал на 14 и 30 сутки относительно 3 и 7 суток эксперимента. Более того, показатель микроциркуляции при ИКГМ на 14 и 30 сутки не отличался от соответствующих значений в группе ложнооперированных животных.

Таблица 12

Влияние эритропоэтина на показатель микроциркуляции при экспериментальной ИКГМ (Me [Q1-Q3], пф. ед.)

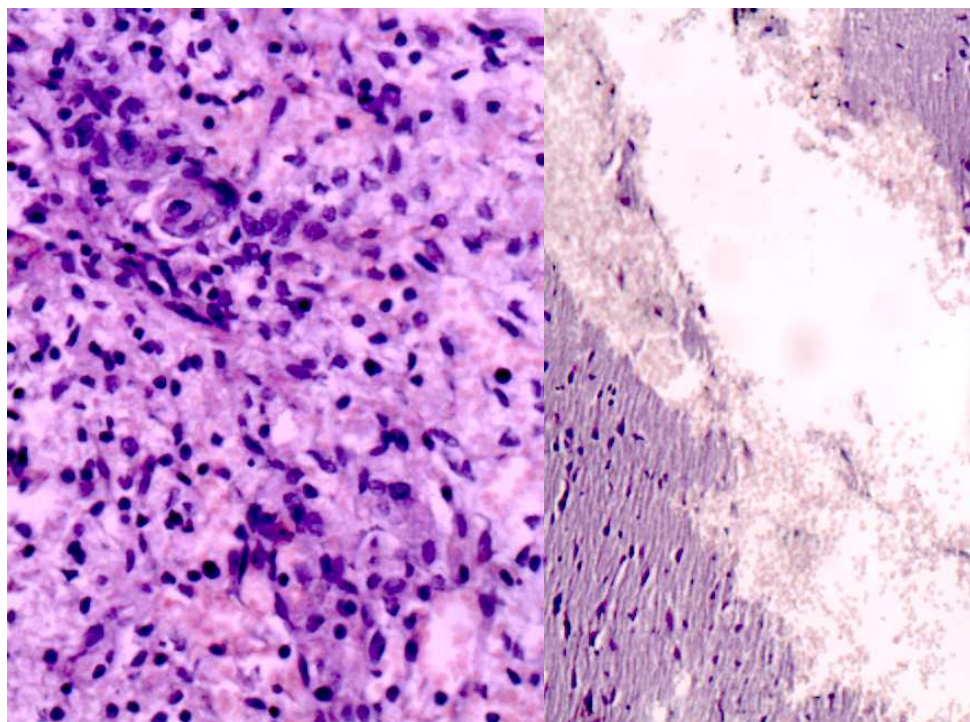
Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	5,19 [4,54-6,95]	5,29 [4,87-6,95]	5,19 [4,57-6,95]	5,21 [4,53-6,95]
2. ИКГМ	2,34 [1,61-3,86]	2,75 [0,89-3,87]	2,57 [1,36-5,48]	3,77 [2,93-4,38]
3. ИКГМ + ЭПО	2,99 [2,67-3,79]	3,34 [1,93-4,60]	5,33 [4,02-7,05]	5,78 [3,38-6,78]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-3} < 0,01$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-3} < 0,01$	$P_{1-2} = 0,016$ $P_{2-3} < 0,01$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,01$

Таким образом, показатель микроциркуляции при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО полностью восстанавливается на 14 и 30 сутки наблюдения.

3.2.3 Влияние эритропоэтина на морфологию и экспрессию VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Для дальнейшего уточнения механизма нейропротекторного действия ЭПО проведены морфологические исследования в очаге ишемического повреждения при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО. При исследовании гистологических препаратов головного мозга на 7 сутки в зоне коагуляции пиальных сосудов сформировались глиосоединительнотканые рубцы (рисунок 5А). В этой же зоне сохранялись единичные мелкоочаговые кровоизлияния. Здесь на 14 сутки эксперимента в области кровоизлияний сформировались кистовидные полости (рисунок 5Б). На 7, 14, 30 сутки наблюдения в окружающей ткани головного мозга отмечалась хорошая сохранность нейронов, среди которых встречались отдельные гиперхромные клетки, а единичные – были с признаками острого набухания и сморщивания (рисунок 6А). Определялись полнокровные сосуды, активная пролиферация глиоцитов, а также эндотелиоцитов, капилляров и артериол (рисунок 6Б), неповрежденные нервные волокна (рисунок 6В).

Результаты морфометрического анализа гистологических препаратов представлены в таблице 13. Как видно, уже на 3 сутки эксперимента (суммарная доза введенного ЭПО 15 000 МЕ/кг) зафиксированы статистически значимые изменения по сравнению с группой животных с ИКГМ: увеличивается количество интактных нейронов (на 88% по медиане), т. е. меньше нейронов было необратимо повреждено при ишемии головного мозга; снижается количество нейронов с хроматолизом (на 61% по медиане), количество клеток-теней (в 4,6 раза по медиане). В среднем на 70% возрастает количество мелких кровеносных сосудов.



А

Б

Рисунок 5 – Морфологические изменения в очаге ишемического повреждения головного мозга в условиях применения эритропоэтина: А – формирование глиосоединительнотканых рубцов в зоне коагуляции пимальных сосудов на 7 сутки эксперимента (окраска гематоксилином и эозином, ув. x400); Б - формирование кистовидной полости в зоне кровоизлияния на 14 сутки эксперимента (окраска гематоксилином и эозином, ув. x200)

Площадь инфаркта на 3 сутки эксперимента на фоне применения ЭПО уменьшилась по медиане на 25%. Количество глиоцитов в очаге ишемического повреждения в условиях применения ЭПО значимо не изменялось на всех сроках наблюдения.

Аналогичные по направленности изменения морфометрических показателей зафиксированы на 7 и 14 сутки экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО. Так, количество интактных нейронов возрастает на 7 сутки на 131%, на 14 сутки – на 196%. Количество нейронов с хроматолизом на 7 сутки снижается в 2,9 раза, на 14 сутки – в 4,9 раза. Количество клеток-теней на 7 сутки снижается в 6 раз, на 14 сутки – в 10,4 раза. Представительство мелких кровеносных сосудов увеличивается на 7 сутки на 72%, на 14 сутки – на 74%. Наконец, площадь

инфаркта в условиях применения ЭПО снижается на 7 сутки на 27,2%, на 14 сутки – на 41,3%.

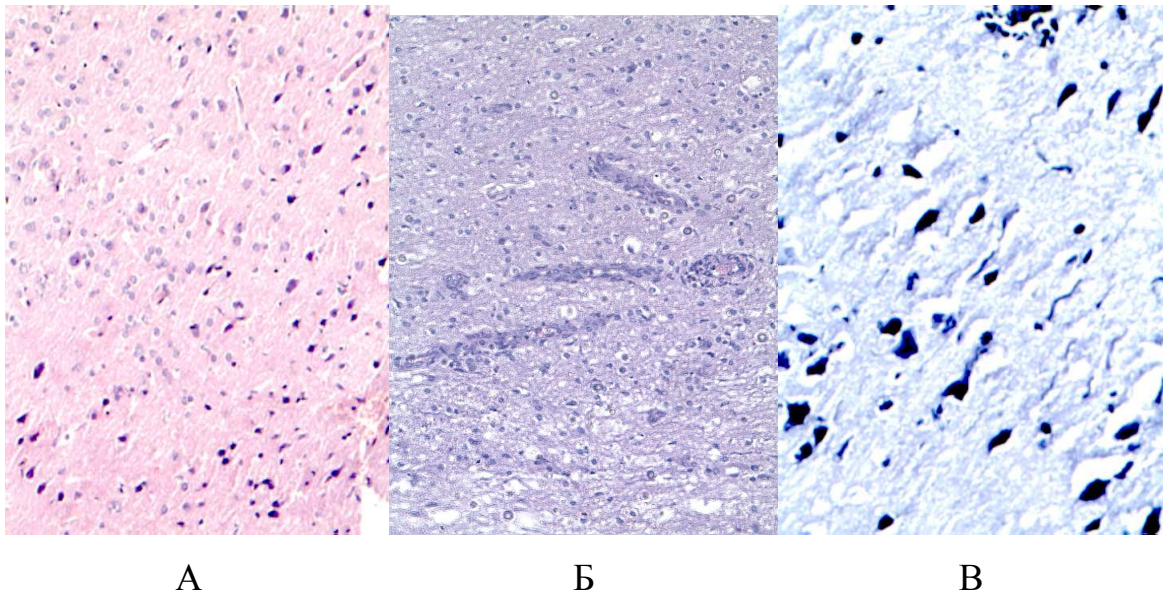


Рисунок 6 – Морфологические изменения в очаге ишемического повреждения головного мозга в условиях применения эритропоэтина на 30 сутки эксперимента: А – сохранившиеся нейроны, отдельные из них гиперхромные, с признаками набухания и сморщивания (окраска гематоксилином и эозином, ув. x200); Б – пролиферация с формированием капилляров и артериол (окраска гематоксилином и эозином, ув. x200); В – неповрежденные нервные волокна (окраска гематоксилином и эозином, ув. x400)

Показательно, что максимальной выраженности эффект ЭПО достиг на 30 сутки эксперимента, когда в группе животных с ИКГМ после активации неоангиогенеза и реперфузии формировались признаки синдрома церебральной ишемии–реперфузии в связи с поступлением фагоцитов и активации процессов свободнорадикального окисления, повреждением нейронов и расширением очага повреждения за счет области полутени (на 33% по сравнению с 14 сутками эксперимента). В условиях применения ЭПО на 30 сутки количество интактных нейронов возросло по медиане на 264% по сравнению с группой животных с ИКГМ без терапевтического воздействия; количество нейронов с хроматолизом было меньше в 7 раз, а количество клеток-теней – в 23,1 раза. При этом количество мелких кровеносных сосудов было выше на 44,1%.

Влияние эритропоэтина на морфометрические показатели в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ (Me [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)
ИН, ед./мм ²	40,47 [37,25- 46,54]	74,98 [71,00- 78,43] *	36,50 [30,87- 42,77]	83,4 [79,30- 87,86] *	30,38 [23,08-36,39]	89,94 [87,64- 91,65] *	25,21 [15,96-32,29]	91,26 [84,71- 98,25]*
НХр, ед./мм ²	36,44 [31,96- 38,11]*	14,65 [11,95- 17,23] *	25,94 [25,21- 26,73]	9,24 [8,96- 10,65] *	34,10 [32,03-35,09]	7,08 [6,78- 7,73] *	42,10 [40,45-43,10]	6,10 [5,99- 6,18] *
КТ, ед./мм ²	56,74 [51,69- 60,03]	12,43 [10,89- 13,45] *	62,25 [58,08- 66,84]	10,28 [9,29- 11,65] *	70,75 [67,04-72,68]	6,76 [6,15- 7,64] *	76,35 [70,77-78,01]	3,30 [2,71- 3,95] *
Гл, ед./мм ²	123,55 [115,20- 138,16]	132,75 [129,11- 139,33]	119,45 [115,54- 125,13]	129,28 [125,13- 132,54]	133,53 [130,48- 136,89]	138,54 [130,65- 142,36]	120,03 [117,96- 123,62]	129,22 [118,23- 135,83]
МС, ед./мм ²	5,27 [4,43-5,55]	8,92 [7,15-9,86] *	7,13 [6,41-7,87]	12,27 [11,62- 14,04] *	8,84 [7,73-10,14]	15,41 [14,52- 16,42] *	14,26 [11,93-16,01]	20,63 [18,76- 22,60]*
ПИ, мкм ²	557,13 [541,38- 582,23]	423,23 [410,90- 437,93]*	604,06 [593,48- 625,80]	440,17 [426,27- 450,69]*	734,66 [718,89- 744,00]	431,50 [423,40- 441,81]*	994,65 [968,38- 995,85]	346,28 [327,98- 358,30]*

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 2; ИН – интактные нейроны, НХр – нейроны с хроматолизом, КТ – клетки-тени, Гл – глиоциты, МС – мелкие сосуды, ПИ – площадь инфаркта.

Наконец, интегральный показатель интенсивности деструктивных процессов в очаге повреждения – площадь инфаркта – снижался по медиане на 65,2% по сравнению с группой животных с ИКГМ.

Результаты исследования экспрессии VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО представлены в таблице 14. Как видно, ЭПО не изменяет экспрессию VEGF в очаге ишемического повреждения на 3, 7, 14, 30 сутки наблюдения.

Таблица 14

Влияние эритропоетина на экспрессию VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ (Me [Q1-Q3], количество клеток / у.е. площади)

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	8,50 [7,00; 9,00]	9,50 [8,00; 10,00]	10,00 [8,75; 11,25]	10,00 [10,00; 12,00]
2. ИКГМ	13,50 [12,75; 15,0]	19,50 [18,0; 20,25]	30,00 [28,75; 31,00]	39,50 [38,00; 41,25]
3. ИКГМ + ЭПО	14,00 [12,75;15,0]	20,00 [17,75;21,25]	30,00 [28,75;31,5]	40,50 [39,0;42,25]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-3}<0,01$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-3}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-3}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-3}<0,001$

Таким образом, 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 клеточ-теней, снижается площадь инфаркта, не изменяется экспрессия VEGF.

По всей видимости, активация неоангиогенеза и установленное ранее увеличение количества мелких кровеносных сосудов при морфометрическом исследовании очага ишемии обусловлено прямыми рост-стимулирующими эффектами ЭПО. Кроме того, в отношении нейропротекторного действия ЭПО при ИКГМ нельзя исключить другие механизмы действия ЭПО, в частности,

активацию эритропоэза и увеличение кислородной емкости крови, улучшение кислородообеспечения нейронов, а также ограничение лейкоцитарной экспансии очага ишемического повреждения в коре больших полушарий головного мозга. Оба фактора могут иметь значение в нейропротекции и нейротрофике, уменьшении зоны пенумбры в очаге церебральной ишемии. Эти предположения явились предметом дальнейшего исследования при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО.

3.2.4 Влияние эритропоэтина на гематологические показатели крови при экспериментальной ишемии коры головного мозга

ЭПО является известным фактором для пролиферации, дифференцировки, ограничения апоптоза эритроидных клеток-предшественниц в костном мозге. Главным эффектом ЭПО является снижение скорости апоптоза эритроидных клеток-предшественниц в костном мозге, на которые ЭПО оказывает действие через поверхностные рецепторы [131, 288]. Максимальное представление рецепторов ЭПО обнаруживается на КОЕ-Э и пронормобластах, в процессе эритропоэза количество рецепторов снижается, а ретикулоцит и эритроцит не имеют их совсем. Однако в настоящее время ЭПО рассматривается как мультипотентный гемопоэтический фактор, а также регулятор функциональной активности клеток крови, прежде всего, лейкоцитов (регулятор адгезии, хемотаксиса, поглотительной и киллинговой способности фагоцитов), ингибитор апоптоза циркулирующих лимфоцитов и обладающий другими свойствами фактор [100].

Применение ЭПО при экспериментальной ИКГМ приводит к изменению гематологических показателей, что отражено в таблицах 15 и 16. Как видно, в условиях применения ЭПО на 3 сутки наблюдается тенденция к увеличению количества в крови эритроцитов, концентрации гемоглобина и значимое увеличение гематокрита на 14%.

Таблица 15

Влияние эритропоэтина на гематологические показатели при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)
RBC, 10 ¹² /л	5,59 [4,12-7,01]	7,01 [5,22-7,94]	5,95 [5,21-6,74]	9,92 [8,92-13,34] *	8,44 [7,81-8,97]	12,32 [10,22-14,34] *	9,02 [8,33-9,79]	11,04 [10,02-12,37] *
HGB, г/л	130,7 [121,2-155,1]	143,1 [134,0-151,2]	123,2 [121,0-127,3]	171,5 [162,2-194,1] *	155,7 [151,0-157,3]	179,8 [168,9-196,2] *	162,1 [155,6-167,8]	185,2 [171,7-192,9] *
HCT, %	35,2 [33,5-42,1]	40,2 [38,4-46,9] *	40,1 [38,2-46,7]	49,2 [47,8-53,1] *	47,8 [44,2-49,7]	51,2 [48,5-55,2] *	49,0 [46,1-50,7]	52,8 [50,3-56,3] *
MCV, фл	62,96 [57,13-72,0]	58,48 [55,33-64,52]	63,19 [57,83-74,39]	51,12 [47,0-54,15] *	55,72 [50,81-61,11]	47,11 [39,52-51,88] *	53,95 [52,01-58,81]	49,89 [47,26-54,83]
MCH, пг	22,51 [19,04-23,97]	20,92 [19,14-22,13]	18,47 [15,22-19,88]	17,11 [15,45-18,23]	18,04 [17,42-21,53]	16,08 [14,21-19,71] *	18,29 [18,02-22,31]	18,06 [17,44-21,77]
MCHC, г/дл	35,13 [31,87-37,92]	34,75 [32,07-36,95]	29,13 [26,15-31,72]	33,61 [31,45-35,19]	32,52 [30,41-33,21]	35,22 [32,24-36,91]	32,99 [29,73-35,89]	34,44 [30,94-36,03]

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 эритроците.

Таблица 16

Влияние эритропоэтина на гематологические показатели при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 3. ИКГМ + ЭПО (n=10)
WBC, 10 ⁹ /л	16,27 [13,37- 24,08]	13,28 [12,40- 16,23]	28,45 [19,64- 31,42]	12,14 [9,22- 14,74] *	12,53 [11,22-16,75]	9,42 [8,11- 11,51] *	8,88 [8,02-11,46]	8,01 [7,57-8,58]
Neu, 10 ⁹ /л	3,05 [2,53-8,27]	2,13 [1,20-2,95] *	4,74 [3,95-6,22]	2,56 [1,79-3,34] *	2,41 [1,91-2,92]	1,55 [1,02- 2,42] *	1,92 [1,38-2,77]	1,22 [0,94-1,54] *
Lymph, 10 ⁹ /л	12,37 [12,01- 17,62]	10,78 [8,23-15,60]	22,98 [18,34- 29,92]	9,25 [4,26-7,24] *	9,81 [8,21-14,02]	7,49 [6,75- 7,87] *	6,67 [5,21-8,94]	6,52 [5,72-7,06]
Mon, 10 ⁹ /л	0,51 [0,46-0,99]	0,44 [0,33-0,62]	0,47 [0,46-0,99]	0,39 [0,21-0,49]	0,41 [0,29-0,68]	0,37 [0,28-0,53]	0,31 [0,20-0,41]	0,38 [0,24-0,65]
PLT, 10 ⁹ /л	596 [554-672]	567 [534-621]	622 [595-654]	577 [521-618]	641 [605-682]	592 [574-652]	651 [583-697]	692 [631-738]

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 2; WBC – лейкоциты, Neu – нейтрофилы, Lymph – лимфоциты, Mon – моноциты, PLT – тромбоциты.

Более выраженные, статистически значимые изменения зафиксированы на 7 сутки эксперимента: увеличение количества эритроцитов в крови (на 67% по медиане относительно группы животных с ИКГМ), концентрации гемоглобина в крови (на 39%), увеличение гематокрита (на 22,5%), снижение среднего эритроцитарного объема (на 19%).

Аналогичная тенденция по направленности изменений показателей «красной крови» наблюдается на 14 сутки: увеличение количества эритроцитов в крови (на 49% по медиане относительно группы животных с ИКГМ), концентрации гемоглобина в крови (на 15,5%), увеличение гематокрита (на 7,1%), снижение среднего эритроцитарного объема (на 15,4%), а также снижение среднего содержания гемоглобина в одном эритроците (на 11,1%). На 30 сутки наблюдения количество эритроцитов в крови возрастает на 22,2%, концентрация гемоглобина – на 14,1%, гематокрита – на 6,1%.

Таким образом, при экспериментальной ИКГМ применение ЭПО в суммарной дозе 15 000 МЕ/кг приводит к увеличению количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита на 7, 14, 30 сутки эксперимента, снижению среднего эритроцитарного объема на 7 и 14 сутки, снижению среднего содержания гемоглобина в одном эритроците на 14 сутки эксперимента. Максимальная выраженность эритропоэтического эффекта ЭПО наблюдается на 7 сутки эксперимента, т. е. через 5 суток после последнего введения ЭПО.

Показательно, что по сравнению с группой ложнооперированных животных при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО количество эритроцитов, концентрация гемоглобина в крови, гематокрит снижены ($p < 0,01$) на 3 сутки, увеличены ($p < 0,01$) – на 7, 14, 30 сутки эксперимента; снижены ($p < 0,01$) средний эритроцитарный объем на 7, 14 и 30 сутки, среднее содержание гемоглобина в одном эритроците на 14 сутки эксперимента. Полученные данные позволяют говорить не только о коррекции зафиксированного ранее снижения количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита на 3 и 7 сутки ИКГМ, но и об увеличении содержания эритроцитов и гемоглобина на 7, 14, 30 сутки эксперимента и увеличении таким образом кислородной емкости крови

(объемного содержания кислорода в артериальной крови) и как следствие кислородообеспечения нервной ткани.

Снижение среднего эритроцитарного объема на 7 и 14 сутки, а также снижение среднего содержания гемоглобина в одном эритроците на 14 сутки эксперимента отражает активацию эритропоэза, увеличение синтеза клеток-предшественниц эритроидного ряда костного мозга, выход ретикулоцитов в кровь, увеличение относительного содержания ретикулоцитов среди эритроцитов крови. Как известно, ретикулоцит имеет меньший размер (объем) и меньшее содержание (концентрацию) гемоглобина в цитоплазме по сравнению со зрелыми эритроцитами.

Влияние ЭПО на количественный состав лейкоцитов в крови при экспериментальной ИКГМ видно из представленной выше таблицы 16. На 3 сутки эксперимента значительно снижается количество в крови нейтрофилов, на правах тенденции снижается общее количество лейкоцитов и количество лимфоцитов. На 7 и 14 сутки наблюдения снижается общее количество лейкоцитов за счет снижения представительства в крови нейтрофилов и лимфоцитов. На 30 сутки эксперимента общее количество лейкоцитов и количество лимфоцитов достоверно не изменяются, зафиксировано только снижение количества нейтрофилов.

Отметим, что по сравнению с группой ложнооперированных животных при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО на 3, 7 и 14 сутки наблюдения общее количество лейкоцитов, количество нейтрофилов и количество лимфоцитов повышено, а на 30 сутки не имеет значимых отличий.

Таким образом, применение ЭПО при экспериментальной ИКГМ приводит к снижению количества нейтрофилов в крови во все сроки наблюдения (3, 7, 14, 30 сутки), а также к снижению общего количества лейкоцитов и количества лимфоцитов 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 наблюдения.

Полагаем, что полученные результаты изменений количества лейкоцитов в крови в определенной мере связаны с нейропротекторными свойствами ЭПО в очаге повреждения, улучшением кислородообеспечения области церебральной ишемии и как следствие уменьшением площади инфаркта, зоны пенумбры, что обуславливает меньшую выраженность реакции миелоидного ростка костного мозга на повреждение нервной ткани, а значит меньшее количество лейкоцитов в крови, прежде всего, нейтрофилов.

В свою очередь, снижение количества нейтрофилов в крови при экспериментальной ИКГМ разрывает один из *circulus vitiosus* в патогенезе синдрома церебральной ишемии–реперфузии, так как это ограничивает количество поступающих в область повреждения нервной ткани нейтрофилов из крови после восстановления кровотока и соответственно их повреждающий эффект на нейроны в связи с синтезом и секрецией агрессивных цитотоксических факторов, таких как активные формы кислорода, ферменты и др.

Выводы по разделу 3.2

1. При экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО интегральный показатель неврологического статуса, оцениваемый по шкале Garcia J. H., восстанавливается частично на 3 и 7 сутки, полностью – к 14 суткам наблюдения, ориентировочно-исследовательское поведение крыс восстанавливается частично на 3, 7 и 14 сутки, полностью – к 30 суткам наблюдения. ЭПО восстанавливает показатель микроциркуляции в очаге ишемического повреждения на 14 и 30 сутки наблюдения.

2. 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 клеточных теньей, снижается площадь инфаркта, не изменяется экспрессия VEGF.

3. При экспериментальной ИКГМ применение ЭПО в суммарной дозе 15 000 МЕ/кг приводит к увеличению количества эритроцитов, гемоглобина,

гематокрита на 7, 14, 30 сутки эксперимента, снижению среднего эритроцитарного объема на 7 и 14 сутки, снижению среднего содержания гемоглобина в одном эритроците на 14 сутки эксперимента. Максимальная выраженность эритропоэтического эффекта ЭПО наблюдается на 7 сутки эксперимента. В условиях применения ЭПО снижается количество нейтрофилов в крови во все сроки наблюдения, общее количество лейкоцитов и количество лимфоцитов – 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.

3.3 Нейропротекторные аспекты применения лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

3.3.1 Влияние лазерного излучения на неврологический и этологический статус крыс при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Лазерное излучение непрерывного инфракрасного диапазона (длина волны 970 нм, мощность 1 Вт) в дистанционном режиме работы эффективно применяется при поражениях ЦНС ишемического, травматического, дегенеративного генеза [159, 193, 194, 220, 253]. Однако механизм нейропротекторного действия ЛИ до конца не ясен, а полученные разными исследователями результаты зачастую противоречат друг другу, что обусловлено использованием различных источников и режимов лазерного излучения, объектов клинического и экспериментального исследования, толщины костей черепа, степени гидратации нервной ткани и других факторов. Сложившаяся ситуация требует проведения дополнительных исследований, во-первых, фиксирующих факт нейропротекторного действия в динамике ИКГМ и, во-вторых, уточняющих механизм нейротропных эффектов ЛИ при ишемических поражениях ЦНС.

Результаты исследования неврологического статуса при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЛИ представлены в таблице 17.

Влияние лазерного излучения на неврологический статус при экспериментальной ИКГМ по шкале Garcia J. H. (Me [Q1-Q3], баллы)

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	18 [17,00-18,00]	18 [18,00-18,00]	18 [18,00-18,00]	18 [18,00-18,00]
2. ИКГМ	6 [5,00-7,25]	9 [8,00-10,5]	12 [11,0-13,0]	15 [14,0-16,25]
4. ИКГМ + ЛИ	9 [7,75-9,25]	10,5 [10,00-12,00]	13,5 [12,75-15,0]	16 [15,00-17,25]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-4}<0,001$ $P_{2-4}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-4}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-4}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$

На 3 сутки эксперимента интегральный показатель по шкале Garcia J. H. значимо увеличивается на 50% по медиане относительно группы животных с ИКГМ, на 7, 14, 30 сутки эксперимента интегральный показатель статистически значимо не изменяется, фиксируется на правах тенденции его повышение. По сравнению с группой ложнооперированных животных интегральный показатель неврологического статуса снижен на 3, 7, 14 сутки наблюдения, а на 30 сутки не отличается от группы ложнооперированных животных.

Итак, в условиях применения ЛИ при экспериментальной ИКГМ наблюдается повышение интегрального показателя неврологического статуса на 3 сутки наблюдения и его восстановление к 30 суткам наблюдения.

При оценке этологического статуса крыс при ИКГМ в условиях применения ЛИ установлены следующие изменения (таблица 18). На 3 сутки эксперимента горизонтальная активность животных статистически значимо возрастает на 57% по медиане, другие показатели достоверно не изменяются, несмотря на тенденцию к повышению исследовательской активности животных. На 7 сутки наблюдения значимо повышается только вертикальная активность крыс (на 50% по медиане относительно группы животных с ИКГМ).

Влияние лазерного излучения на показатели теста «открытое поле» при экспериментальной ИКГМ (Me [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 4. ИКГМ + ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 4. ИКГМ + ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 4. ИКГМ + ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 4. ИКГМ + ЛИ (n=10)
ГА, актов	7,0 [6,0; 8,0]	11,0 [9,0; 10,5] *	12,0 [11,5; 12,75]	13,5 [12,75; 14,25]	8,0 [7,75; 8,75]	12,0 [10,00- 15,00] *	10,5 [8,75; 11,25]	15,5 [14,0; 17,0] *
ВА, актов	4,0 [3,0; 5,0]	4,0 [3,75; 4,25]	3,0 [1,75; 4,0]	6,0 [5,75; 7,0] *	3,0 [2,75; 4,25]	7,0 [5,0; 10,0] *	5,0 [4,75; 6,0]	8,0 [7,0; 8,25] *
ИА, актов	2,0 [2,0; 3,0]	3,5 [2,75; 4,0]	4,0 [3,75; 5,0]	5,0 [4,0; 5,25]	3,0 [3,0; 4,0]	5,0 [4,0; 6,0]	4,0 [3,0; 5,0]	7,0 [7,0; 8,0] *
Гр, актов	1,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,25]	2,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,75; 3,0]	1,5 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,25]	3,0 [2,75; 3,25]
ФБ, кол-во	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [0,75; 1,25]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 3,0]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [0,0; 1,0]

Примечание: * – значимые ($p < 0,01$) различия с группой 2; ГА – горизонтальная активность, ВА – вертикальная активность, ИА – исследовательская активность, Гр – груминг, ФБ – фекальные болюсы.

На 14 сутки повышается горизонтальная активность (на 50% по медиане), вертикальная активность животных (на 133% по медиане). Максимальной выраженности эффект ЛИ на этологический статус при ИКГМ зафиксирован на 30 сутки эксперимента, когда повысились горизонтальная активность (на 52% по медиане), вертикальная активность (на 60% по медиане) и исследовательская активность животных (на 75% по медиане).

Следует отметить, что по сравнению с группой ложнооперированных животных изменения этологического статуса при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЛИ включают на 3 сутки снижение ($p<0,01$) горизонтальной активности, вертикальной активности и исследовательской активности животных, на 7 и 14 сутки – снижение ($p<0,01$) горизонтальной активности и вертикальной активности, на 30 сутки – снижение ($p<0,01$) исследовательской активности животных.

Таким образом, максимальный эффект ЛИ при экспериментальной ИКГМ зафиксирован на 14 и 30 сутки наблюдения, в условиях воздействия ЛИ вертикальная активность животных восстанавливается начиная с 7 суток, исследовательская активность восстанавливается на 30 сутки эксперимента. Полученные результаты позволяют констатировать ускорение восстановления ориентировочно-исследовательского поведения при экспериментальной ИКГМ после однократного воздействия ЛИ.

3.3.2 Влияние лазерного излучения на микроциркуляцию в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Полагаем, что установленные выше эффекты ЛИ на неврологический статус и этологический статус при экспериментальной ИКГМ в определенной мере обусловлены эффектами лазерной терапии на микроциркуляцию в очаге ишемического повреждения. Ранее были продемонстрированы эффекты ЛИ на реваскуляризацию очага повреждения в миокарде, печени, коже и других тканях и органах [16, 17, 18, 19, 20, 78, 79].

Результаты оценки показателя микроциркуляции в очаге ишемического повреждения представлены в таблице 19. Как видно, на 3 и 7 сутки эксперимента наблюдается только тенденция к увеличению показателя без статистической значимости отличий с группой животных с ИКГМ без терапевтического воздействия. На 14 сутки наблюдения показатель микроциркуляции статистически значимо возрастает на 38% (по медиане относительно группы животных с ИКГМ), на 30 сутки – на 38%.

Таблица 19

Влияние лазерного излучения на показатель микроциркуляции при экспериментальной ИКГМ (Me [Q1-Q3], пф. ед.)

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	5,19 [4,54-6,95]	5,29 [4,87-6,95]	5,19 [4,57-6,95]	5,21 [4,53-6,95]
2. ИКГМ	2,34 [1,61-3,86]	2,75 [0,89-3,87]	2,57 [1,36-5,48]	3,77 [2,93-4,38]
4. ИКГМ + ЛИ	3,49 [2,15-4,6]	3,40 [2,70-4,15]	4,55 [3,75-5,47]	5,20 [3,9-6,39]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-4} < 0,01$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-4} < 0,01$	$P_{1-2} = 0,016$ $P_{2-4} < 0,01$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{2-4} < 0,01$

Примечательно, что по сравнению с группой ложнооперированных животных на 3 и 7 сутки зафиксировано снижение показателя микроциркуляции, а на 14 и 30 сутки – отсутствие значимых отличий.

Таким образом, при экспериментальной ИКГМ эффект ЛИ зафиксирован на 14 и 30 сутки наблюдения, а с 14 суток показатель микроциркуляции полностью восстанавливается (не отличается от группы ложнооперированных животных).

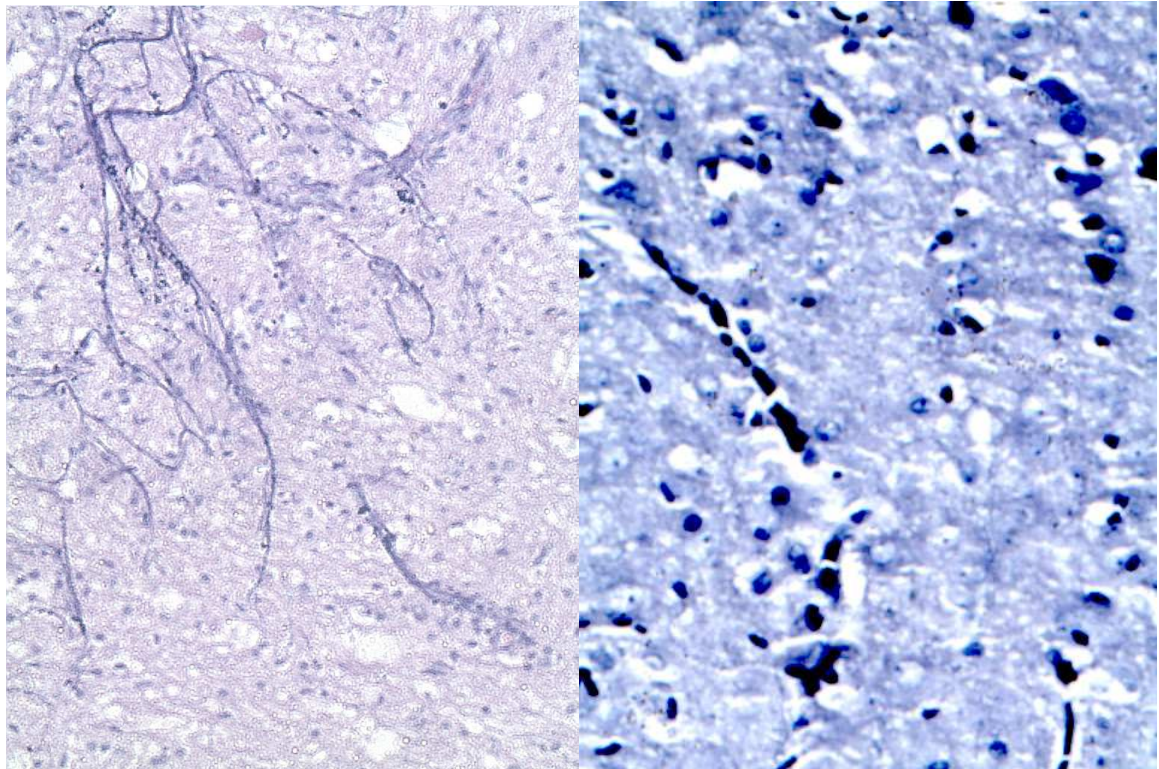
Безусловно, наибольший интерес в плане объяснения механизма нейропротекторного действия ЛИ при ИКГМ представляют данные морфологического исследования очага ишемического повреждения, в том числе экспрессии вазоэндотелиального фактора роста, а также изменения

количественного состава клеток в системном кровотоке, что и явилось предметом следующих разделов исследования.

3.3.3 Влияние лазерного излучения на морфологию и экспрессию VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

При микроскопическом исследовании гистологических препаратов головного мозга в зоне коагуляции пияльных сосудов определялись признаки некроза эндотелия и стенки отдельных капилляров и артерий, сопровождавшиеся мелкоочаговыми кровоизлияниями. В окружающей ткани мозга отмечались деструктивные изменения ядер и цитоплазмы отдельных нейронов, а также полнокровие сосудов, пролиферация глиоцитов, эндотелиоцитов кровеносных сосудов (рисунок 7А). Данные морфологические изменения сохранялись до 14 суток опыта. На этом сроке наблюдения в местах кровоизлияний сформировались кистовидные полости, которые наблюдались вплоть до 30 суток эксперимента. В это время регистрировалась лучшая сохранность нейронов, лишь отдельные из которых находились в состоянии набухания и сморщивания. Наблюдалась пролиферация глиоцитов, а также эндотелиоцитов капилляров и артериол, полнокровие сосудов, ремиелинизация поврежденных нервных волокон (рисунок 7Б).

Результаты морфометрического анализа очага ишемического повреждения при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЛИ представлены в таблице 20. На 3 сутки эксперимента увеличивается количество интактных нейронов (на 45% по медиане по сравнению с группой животных с ИКГМ без терапевтического воздействия), снижается количество нейронов с хроматолизом (на 22% по медиане) и клеток-теней (на 68% по медиане); количество мелких сосудов и площадь инфаркта достоверно не изменяются, отметим тенденцию к снижению площади инфаркта.



А

Б

Рисунок 7 – Морфологические изменения в очаге ишемического повреждения головного мозга в условиях применения лазерного излучения на 30 сутки эксперимента: А – пролиферация эндотелиоцитов с формированием капилляров на 7 сутки эксперимента (окраска гематоксилином и эозином, ув. x200); Б – ремиелинизация поврежденных нервных волокон на 30 сутки эксперимента (окраска по Шпильмейеру, ув. x400)

7 сутки наблюдения характеризуются более выраженными изменениями в очаге повреждения: увеличением количества интактных нейронов (на 75% по медиане), снижением количества нейронов с хроматолизом (на 56% по медиане) и клеток-теней (на 76% по медиане); увеличением количества мелких кровеносных сосудов (на 73% по медиане) и снижением площади инфаркта (на 20% по медиане), кроме этого, на правах тенденции увеличивалось количество глиоцитов.

На 14 сутки экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЛИ в очаге повреждения количество интактных нейронов возрастало в 1,4 раза, количество нейронов с хроматолизом снижалось на 72%, а количество клеток-теней – на 83%,

Влияние лазерного излучения на морфометрические показатели в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ (Me [Q1-Q3])

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=10)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)
ИН, ед./мм ²	40,47 [37,25- 46,54]	58,13 [55,41- 60,42] *	36,50 [30,87- 42,77]	63,35 [61,47- 66,85] *	30,38 [23,08-36,39]	71,87 [69,09- 74,00] *	25,21 [15,96-32,29]	82,11 [80,15- 85,36] *
НХр, ед./мм ²	36,44 [31,96- 38,11]	28,51 [27,57- 29,50] *	25,94 [25,21- 26,73]	11,93 [11,17- 13,08] *	34,10 [32,03-35,09]	9,68 [8,85- 10,21] *	42,10 [40,45-43,10]	8,01 [7,61- 9,05] *
КТ, ед./мм ²	56,74 [51,69- 60,03]	18,51 [17,57- 19,50] *	62,25 [58,08- 66,84]	15,40 [14,10- 16,56] *	70,75 [67,04-72,68]	11,86 [10,40- 12,81] *	76,35 [70,77-78,01]	7,51 [6,87-8,65] *
Гл, ед./мм ²	123,55 [115,20- 138,16]	129,10 [122,89- 133,84]	119,45 [115,54- 125,13]	131,65 [126,91- 138,27]	133,53 [130,48- 136,89]	144,98 [142,41- 153,23]	120,03 [117,96- 123,62]	159,19 [150,89- 165,00]
МС, ед./мм ²	5,27 [4,43-5,55]	5,90 [5,32-7,31]	7,13 [6,41-7,87]	12,32 [11,63- 13,38]*	8,84 [7,73-10,14]	15,13 [13,95- 17,73]*	14,26 [11,93-16,01]	20,12 [18,12- 21,65] *
ПИ, мкм ²	557,13 [541,38- 582,23]	495,86 [490,81- 508,65]	604,06 [593,48- 625,80]	486,71 [473,98- 494,20]*	734,66 [718,89- 744,00]	459,14 [454,30- 476,38]*	994,65 [968,38- 995,85]	349,01 [339,38- 362,90]*

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 2; ИН – интактные нейроны, НХр – нейроны с хроматолизом, КТ – клетки-тени, Гл – глиоциты, МС – мелкие сосуды, ПИ – площадь инфаркта.

количество мелких сосудов возрастало на 72%, а площадь инфаркта сокращалась на 37% по сравнению с группой животных с ИКГМ без терапевтического воздействия.

Наконец, на 30 сутки наблюдения в очаге ишемического повреждения увеличивается количество интактных нейронов (в 2,3 раза по медиане), снижается количество нейронов с хроматолизом (на 81% по медиане) и клеток-теней (на 91% по медиане); увеличивается количество мелких кровеносных сосудов (на 43% по медиане) и значительно сокращается площадь инфаркта (на 65% по медиане), отметим также тенденцию к увеличению количества глиоцитов.

Таким образом, при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЛИ во все сроки наблюдения увеличивается количество интактных нейронов, снижается количество нейронов с хроматолизом и клеток-теней; кроме этого, на 7, 14, 30 сутки наблюдения увеличивается количество мелких кровеносных сосудов и сокращается площадь инфаркта, на правах тенденции увеличивается количество глиоцитов. Отметим, что максимальная выраженность эффектов ЛИ при экспериментальной ИКГМ наблюдается на 30 сутки наблюдения. Полного восстановления исследуемых морфометрических показателей не происходит, во все сроки эксперимента наблюдаются статистически значимые ($p < 0,01$) отличия с группой ложнооперированных животных по количеству интактных нейронов, нейронов с хроматолизом и клеток-теней, количеству мелких кровеносных сосудов и площади инфаркта.

Далее мы исследовали в очаге ишемического повреждения головного мозга экспрессию VEGF (таблица 21). Во все сроки наблюдения зафиксировано увеличение экспрессии VEGF: на 3 сутки – на 26% (по медиане по сравнению с группой животных с ИКГМ без терапевтического воздействия), на 7 сутки – на 49% (по медиане), на 14 сутки – на 35% (по медиане), на 30 сутки – на 37% (по медиане). Кроме этого, по экспрессии VEGF значимые ($p < 0,01$) отличия зафиксированы и с группой ложнооперированных животных во все сроки наблюдения.

Таблица 21

Влияние лазерного излучения на экспрессию VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3], количество клеток / у.е. площади)

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	8,50 [7,00; 9,00]	9,50 [8,00; 10,00]	10,00 [8,75; 11,25]	10,00 [10,00; 12,00]
2. ИКГМ	13,50 [12,75; 15,0]	19,50 [18,0; 20,25]	30,00 [28,75; 31,00]	39,50 [38,00; 41,25]
4. ИКГМ + ЛИ	17,00 [16,0; 17,25]	29,00 [27,75; 30,0]	40,50 [39,0; 42,0]	54,00 [50,75; 55,25]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-3}<0,001$ $P_{2-4}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-3}<0,001$ $P_{2-4}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-3}<0,001$ $P_{2-4}<0,01$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-3}<0,001$ $P_{2-4}<0,001$

При проведении корреляционного анализа между количеством мелких кровеносных сосудов и экспрессией VEGF при ИКГМ в условиях применения ЛИ выявлено, что на 3 сутки эксперимента значимая связь не наблюдается ($R=0,34$; $p>0,05$), на 7 сутки – сильная положительная связь ($R=0,77$; $p<0,05$), на 14 сутки – слабая положительная связь ($R=0,48$; $p<0,05$), на 30 сутки – сильная средней силы связь ($R=0,53$; $p<0,05$).

Итак, 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, 30 сутки наблюдения увеличивается количество мелких кровеносных сосудов и сокращается площадь инфаркта, на правах тенденции увеличивается количество глиоцитов. Максимальная выраженность эффектов ЛИ на морфологию очага повреждения наблюдается на 30 сутки эксперимента. Количество мелких кровеносных сосудов в очаге повреждения ассоциировано с экспрессией VEGF.

3.3.4 Влияние лазерного излучения на гематологические показатели крови при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Изменения количественного состава клеток в крови являются отражением формирования очага ишемического повреждения при экспериментальной ИКГМ. Как было отмечено в разделе 3.1, при экспериментальной ИКГМ у крыс на 3, 7, 14 сутки наблюдается лейкоцитоз за счет увеличения количества нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, на 3 и 7 сутки снижается количество эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, на 7 сутки снижается среднее содержание гемоглобина в эритроците и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах.

В условиях применения ЛИ при экспериментальной ИКГМ на 3 сутки не наблюдается значимых изменений в крови общего количества лейкоцитов, количества нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов а также количества тромбоцитов (таблица 22). На 7 сутки наблюдения статистически значимо снижается общее количество лейкоцитов (на 25% по медиане по сравнению с группой животных с ИКГМ без терапевтического воздействия), наблюдается тенденция к снижению количества лимфоцитов; количество других лейкоцитов, а также тромбоцитов в крови достоверно не изменяется. На 14 сутки эксперимента общее количество лейкоцитов в крови снижается (на 20% по медиане) за счет снижения представительства лимфоцитов (на 24% по медиане). Наконец, на 30 сутки эксперимента не зафиксировано статистически значимых изменений в крови количества лейкоцитов и тромбоцитов.

По сравнению с ложнооперированными животными наблюдаются значимые ($p < 0,01$) отличия по общему количеству лейкоцитов на 3, 7, 14 сутки, по количеству нейтрофилов – на 3, 7, 14, 30 сутки, по количеству лимфоцитов – на 3, 7, 14 сутки, по количеству моноцитов – на 3, 7 сутки эксперимента. Таким образом, в условиях применения ЛИ при ИКГМ на 7 и 14 сутки снижается в крови общее количество лейкоцитов преимущественно за счет лимфоцитов, полученные результаты позволяют говорить о частичном восстановлении общего

представительства лейкоцитов и лимфоцитов в крови на 7 и 14 сутки эксперимента.

Результаты исследования влияния ЛИ на показатели «красной крови» при экспериментальной ИКГМ представлены в таблице 23. Как видно, на 3, 7, 14, 30 сутки не зафиксировано статистически значимого влияния на количество эритроцитов в крови, концентрацию гемоглобина, гематокрит, средний эритроцитарный объем, среднее содержание гемоглобина в эритроците и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитах. По сравнению с группой ложнооперированных животных на 3 и 7 сутки эксперимента снижается количество эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, на 3, 7 и 14 сутки снижается средний эритроцитарный объем, а на 3 сутки – среднее содержание гемоглобина в эритроците и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах. Таким образом, нами не выявлено значимого влияния ЛИ при экспериментальной ИКГМ на показатели «красной крови».

Полученные результаты при оценке гематологических показателей при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЛИ, по всей видимости, являются отражением событий в очаге повреждения: так, уже на 7 сутки увеличивается количество мелких кровеносных сосудов, на 14 сутки увеличивается экспрессия VEGF, что благоприятно сказывается на кровоснабжении и кислородообеспечении нервной ткани (микроциркуляция в очаге повреждения возрастает на 14 сутки). Как следствие, уменьшается область вторичной альтерации (пенумбры), увеличивается количество интактных нейронов; количество нейронов с хроматолизом, клеток-теней, то есть площадь инфаркта сокращается, а интенсивность деструктивных процессов уменьшается – на это меньше реагируют фагоциты периферической крови при восстановлении кровотока, меньше выделяется аутокоидов в кровоток, реакция миелоидного ростка костного мозга снижается и наблюдается меньшее количество лейкоцитов в кровотоке.

Безусловно, уже на данном этапе возникает вопрос о возможных вариантах механизма нейропротекторного действия ЛИ при экспериментальной ИКГМ.

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

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)
WBC, 10 ⁹ /л	16,27 [13,37- 24,08]	15,14 [14,02- 18,27]	28,45 [19,64- 31,42]	21,75 [17,64- 27,19] *	12,53 [11,22-16,75]	10,12 [9,43- 12,05] *	8,88 [8,02-11,46]	9,97 [7,25-10,84]
Neu, 10 ⁹ /л	3,05 [2,53-8,27]	2,89 [3,11-5,94]	4,74 [3,95-6,22]	3,95 [3,71-5,57]	2,41 [1,91-2,92]	1,88 [1,61-2,34]	1,92 [1,38-2,77]	2,07 [1,31-2,65]
Lymph, 10 ⁹ /л	12,37 [12,01- 17,62]	11,08 [10,26- 14,47]	22,98 [18,34- 29,92]	16,74 [15,22- 25,14]	9,81 [8,21-14,02]	7,45 [6,21- 9,02] *	6,67 [5,21-8,94]	7,31 [6,18-7,99]
Mon, 10 ⁹ /л	0,51 [0,46-0,99]	0,81 [0,55-1,24]	0,47 [0,46-0,99]	0,73 [0,51-1,14]	0,41 [0,29-0,68]	0,45 [0,31-0,59]	0,31 [0,20-0,41]	0,53 [0,31-0,87]
PLT, 10 ⁹ /л	596 [554-672]	627 [547-664]	622 [595-654]	589 [555-621]	641 [605-682]	612 [588-649]	651 [583-697]	687 [612-714]

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 2; WBC – лейкоциты, Neu – нейтрофилы, Lymph – лимфоциты, Mon – моноциты, PLT – тромбоциты.

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

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 4. ИКГМ+ЛИ (n=10)
RBC, 10 ¹² /л	5,59 [4,12-7,01]	4,98 [4,34-6,74]	5,95 [5,21-6,74]	6,52 [6,01-6,98]	8,44 [7,81-8,97]	9,12 [8,45-9,76]	9,02 [8,33-9,79]	10,28 [9,93-11,07] *
HGB, г/л	130,7 [121,2-155,1]	133,4 [129,1-144,2]	123,2 [121,0-127,3]	139,6 [128,8-141,1]	155,7 [151,0-157,3]	159,6 [153,4-162,8]	162,1 [155,6-167,8]	166,5 [161,2-177,1]
HCT, %	35,2 [33,5-42,1]	34,2 [32,1-39,7]	40,1 [38,2-46,7]	41,9 [38,8-45,4]	47,8 [44,2-49,7]	46,4 [43,8-51,2]	49,0 [46,1-50,7]	49,8 [45,7-52,8]
MCV, фл	62,96 [57,13-72,0]	65,37 [59,14-73,55]	63,19 [57,83-74,39]	65,26 [58,76-69,22]	55,72 [50,81-61,11]	52,88 [48,12-59,16]	53,95 [52,01-58,81]	49,98 [49,11-56,23]
MCH, пг	22,51 [19,04-23,97]	24,98 [20,37-25,04]	18,47 [15,22-19,88]	19,97 [17,12-21,08]	18,04 [17,42-21,53]	17,88 [17,32-22,08]	18,29 [18,02-22,31]	17,04 [17,02-23,08]
MCHC, г/дл	35,13 [31,87-37,92]	37,88 [33,12-39,64]	29,13 [26,15-31,72]	31,08 [28,03-32,66]	32,52 [30,41-33,21]	34,01 [31,16-34,87]	32,99 [29,73-35,89]	34,08 [31,13-36,74]

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 эритроците.

По данным обзорной работы по нейропротективным подходам в лечении ишемического инсульта, в настоящее время в доступной литературе представлено более 1 000 экспериментальных отчетов и более 100 клинических испытаний в этой области [8, 152, 230, 236, 237].

Большинство фармакологических агентов, продемонстрировавших эффективность на доклиническом этапе, например, блокаторы кальциевых каналов, цитиколин, агонисты ГАМК, магнезия и др. не подтвердили свою эффективность при проведении метаанализа [249, 251, 300]. Большое внимание среди нефармакологических методов нейропротекции уделяется транскраниальной лазерной терапии ближнего инфракрасного диапазона, гипербарической оксигенотерапии, гипотермии и др. В отношении ЛИ высказывается предположение о так называемой фотобиостимуляции нервной ткани, которая ускоряет восстановление мозга в период ишемии и реперфузии, что было подтверждено рандомизируемыми контролируемыми исследованиями [189, 298, 307, 308]. Особо подчеркивается, что в настоящее время ведутся интенсивные поиски оптимальных нейропротекторных подходов в ведущих мировых центрах инсульта для применения в клинической практике. Полагают, что наибольшую эффективность могут продемонстрировать подходы комплексного применения при ишемических поражениях ЦНС фармакологических препаратов и нефармакологических методов. В этом отношении перспективным может оказаться использование системного применения ЭПО и ЛИ. В связи с этим, на следующем этапе работы исследовали нейропротекторные аспекты комбинированного применения ЭПО и ЛИ при экспериментальной ИКГМ.

Выводы по разделу 3.3

1. В условиях применения ЛИ при экспериментальной ИКГМ интегральный показатель неврологического статуса повышается на 3 сутки и восстанавливается к 30 суткам наблюдения; максимальный эффект на ориентировочно-исследовательское поведение зафиксирован на 14 и 30 сутки, вертикальная

активность восстанавливается начиная с 7 суток, исследовательская активность – на 30 сутки.

2. При экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЛИ в очаге повреждения во все сроки наблюдения увеличивается количество интактных нейронов, снижается – 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. Количество мелких кровеносных сосудов в очаге повреждения нарастает по мере увеличения экспрессии VEGF.

3. 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.

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

3.4.1 Влияние комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на неврологический и этологический статус крыс при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Результаты оценки влияния комбинированного применения ЭПО и ЛИ на интегральный показатель неврологического статуса при экспериментальной ИКГМ представлены в таблице 24. На 3 сутки эксперимента показатель возрастает на 116% по медиане относительно группы животных с ИКГМ без терапевтического воздействия, на 7 сутки – на 67%, на 14 сутки – на 37,5%, на 30 сутки – на 17%. Максимальный эффект комбинированного применения ЭПО и ЛИ зафиксирован на 3 и 7 сутки наблюдения.

Влияние комбинированного применения эритропоетина и лазерного излучения на неврологический статус при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3], баллы)

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	18 [17,00-18,00]	18 [18,00-18,00]	18 [18,00-18,00]	18 [18,00-18,00]
2. ИКГМ	6 [5,00-7,25]	9 [8,00-10,5]	12 [11,0-13,0]	15 [14,0-16,25]
5. ИКГМ + ЭПО + ЛИ	13 [11,50-14,00]	15 [13,75-16]	16,5 [15,0-17,0]	17,5 [16,75-18,0]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-5}<0,001$ $P_{2-5}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-5}<0,01$ $P_{2-5}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{2-5}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{2-5}<0,001$

В условиях применения ЭПО и ЛИ интегральный показатель неврологического статуса на 3 и 7 сутки значительно отличается, а на 14 и 30 сутки не имеет статистически значимых различий с группой ложнооперированных животных, что позволяет говорить на 3 и 7 сутки эксперимента о частичном, а на 14 и 30 сутки – о полном восстановлении интегрального показателя неврологического статуса при ИКГМ.

Далее оценивали этологический статус крыс в тесте «открытое поле» при ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ (таблица 25). На 3 сутки эксперимента увеличивается горизонтальная активность животных на 100% (по медиане относительно группы животных с ИКГМ без терапевтического воздействия), вертикальная активность – на 50%, исследовательская активность – на 175%. 7 сутки наблюдения отличались приростом горизонтальной активности крыс на 29%, вертикальной активности – на 150%, исследовательской активности – на 75%.

Влияние комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на показатели теста «открытое поле» при экспериментальной ИКГМ (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 +ЛИ (n=10)
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] *
ВА, актов	4,0 [3,0; 5,0]	6,0 [5,75; 7,0] *	3,0 [1,75; 4,0]	7,5 [7,0; 8,25] *	3,0 [2,75; 4,25]	7,0 [5,75; 8,0] *	5,0 [4,75; 6,0]	8,0 [7,75;9,25] *
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] *
Гр, актов	1,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 3,0]	2,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,0]	1,5 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,25]	2,0 [1,0; 2,25]	2,0 [1,75; 3,0]
ФБ, кол-во	1,0 [1,0; 2,0]	1,5 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 3,0]	1,0 [1,0; 1,25]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [0,0; 1,0]

Примечание: * – значимые ($p < 0,01$) различия с группой 2; ГА – горизонтальная активность, ВА – вертикальная активность, ИА – исследовательская активность, Гр – груминг, ФБ – фекальные болюсы.

На 14 сутки эксперимента горизонтальная активность возросла на 100%, вертикальная активность – на 133%, исследовательская активность – на 133%. Аналогичные по направленности изменения этологического статуса животных зафиксированы на 30 сутки эксперимента: увеличение горизонтальной активности крыс на 81%, вертикальной активности – на 60%, исследовательской активности – на 100%. Количество актов груминга и фекальных болюсов значимо не отличалось от группы животных с ИКГМ во все сроки наблюдения. Как видно, максимальный эффект комбинированного применения ЭПО и ЛИ при ИКГМ на ориентировочно-исследовательское поведение крыс в тесте «открытое поле» зафиксирован на 14 сутки эксперимента.

Отметим, что по сравнению с группой ложнооперированных животных статистически значимые ($p < 0,01$) отличия зафиксированы на 3 сутки эксперимента по горизонтальной и исследовательской активности, на 7 и 14 сутки – по горизонтальной активности. Таким образом, вертикальная активность животных полностью восстанавливается с 3 суток наблюдения, исследовательская активность полностью восстанавливается с 7 суток (частично – с 3 суток), горизонтальная активность полностью восстанавливается на 30 сутки (частично – с 3 суток).

Итак, при экспериментальной ИКГМ в условиях 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.

Полагаем, что механизм нейропротекторного действия комбинированного применения ЭПО и ЛИ при ИКГМ связан с изменением микроциркуляции, структурных изменений в очаге ишемического повреждения и системными гематологическими реакциями, что было отмечено выше в отношении монотерапии ЭПО и ЛИ.

3.4.2 Влияние комбинированного применения эритропоетина и лазерного излучения на микроциркуляцию в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Результаты исследования микроциркуляции в динамике экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ представлены в таблице 26. На 3, 7, 14, 30 сутки эксперимента показатель микроциркуляции увеличивается. В относительных величинах по отношению к группе животных с ИКГМ без лечения – соответственно на 265, 185, 156, 89%. Максимальный прирост наблюдается на 3 сутки наблюдения, а затем прогрессивно падает. По сравнению с группой ложнооперированных животных статистически значимые различия зафиксированы только на 3 и 7 сутки эксперимента.

Таблица 26

Влияние комбинированного применения эритропоетина и лазерного излучения на показатель микроциркуляции при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3], пф. ед.)

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	5,19 [4,54-6,95]	5,29 [4,87-6,95]	5,19 [4,57-6,95]	5,21 [4,53-6,95]
2. ИКГМ	2,34 [1,61-3,86]	2,75 [0,89-3,87]	2,57 [1,36-5,48]	3,77 [2,93-4,38]
5. ИКГМ + ЭПО + ЛИ	8,41 [7,84;8,68]	7,86 [6,65-8,78]	6,62 [5,71-7,67]	6,38 [5,77-6,81]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-5}<0,01$ $P_{2-5}<0,001$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{1-5}<0,01$ $P_{2-5}<0,001$	$P_{1-2}=0,016$ $P_{2-5}<0,01$	$P_{1-2}<0,001$ $P_{2-5}<0,01$

Таким образом, при экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ показатель микроциркуляции увеличивается во все сроки наблюдения и полностью восстанавливается на 14 и 30 сутки эксперимента.

3.4.3 Влияние комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на морфологию и экспрессию VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Начиная с 7 суток эксперимента в гистологических препаратах головного мозга определялись мелкоочаговые кровоизлияния, сформированные глиосоединительнотканые рубцы в зоне коагуляции пияльных сосудов. В окружающей ткани головного мозга отмечались хорошо сохранившиеся нейроны, среди которых лишь единичные находились в состоянии набухания и сморщивания. Регистрировались сохранившиеся нервные волокна, выраженная пролиферация глиоцитов, эндотелиоцитов с формированием капилляров и артериол (рисунок 8). Сходные морфологические изменения сохранялись на 14 и 30 сутки опыта, но лишь с той разницей, что на указанных сроках наблюдения в зоне мелкоочаговых кровоизлияний определялись кистовидные полости.

При морфометрическом исследовании очага ишемического повреждения при экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ установлены следующие изменения (таблица 27). На 3 сутки эксперимента увеличивается количество интактных нейронов в очаге повреждения (на 105% по медиане относительно животных с ИКГМ без терапевтического воздействия), снижается количество нейронов с хроматолизом (на 45%) и количество клеток-теней (на 84%), на этом фоне увеличивается количество мелких кровеносных сосудов (на 130%) и уменьшается площадь инфаркта (на 29%), на правах тенденции возрастает количество глиоцитов. Итак, уже на 3 сутки после индукции ИКГМ в очаге повреждения зафиксированы значительные морфологические изменения, свидетельствующие об ограничении зоны повреждения, неоваскуляризации и сохранности нейронов.

На 7 сутки наблюдения увеличивается количество интактных нейронов (на 156%), снижается количество нейронов с хроматолизом (на 69%) и количество клеток-теней (на 89%), увеличивается количество мелких кровеносных сосудов (на 117%) и уменьшается площадь инфаркта (на 53%), значимо увеличивается

количество глиоцитов (на 11%). Как видно, на 7 сутки эксперимента выраженность эффекта комбинированного применения ЭПО и ЛИ при ИКГМ возрастает.

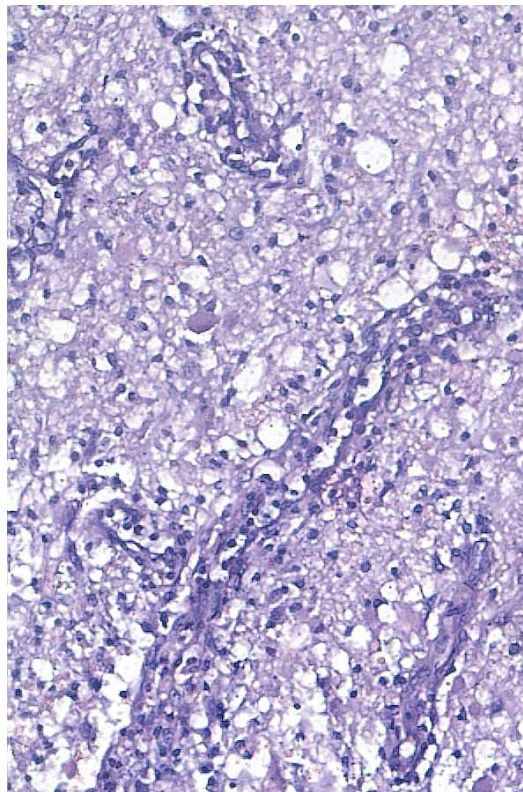


Рисунок 8 – Морфологические изменения в очаге ишемического повреждения головного мозга в условиях комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на 7 сутки эксперимента; пролиферация эндотелиоцитов с формированием капилляров и артериол (окраска гематоксилином и эозином, ув. x400)

Направление изменений морфометрических показателей на 3 и 7 сутки при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО и ЛИ сохранилось на 14 и 30 сутки. Так, на 14 сутки наблюдений увеличивается количество интактных нейронов в очаге повреждения (на 217% по медиане относительно животных без терапевтического воздействия), снижается количество нейронов с хроматолизом (на 82%) и количество клеток-теней (на 96%), увеличивается количество мелких кровеносных сосудов (на 142%) и уменьшается площадь инфаркта (на 67%), статистически значимо возрастает количество глиоцитов (на 33%).

Влияние комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения на морфометрические показатели в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ (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 +ЛИ (n=10)
ИН, ед./мм ²	40,47 [37,25- 46,54]	82,03 [79,91- 84,79] *	36,50 [30,87- 42,77]	92,95 [91,34- 93,85] *	30,38 [23,08- 36,39]	95,71 [90,40- 96,67] *	25,21 [15,96-32,29]	99,67 [95,12- 103,01] *
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] *
КТ, ед./мм ²	56,74 [51,69- 60,03]	9,22 [8,45- 11,40] *	62,25 [58,08- 66,84]	7,23 [6,18-7,66] *	70,75 [67,04- 72,68]	3,84 [3,60-4,75] *	76,35 [70,77-78,01]	2,05 [1,87-2,39] *
Гл, ед./мм ²	123,55 [115,20- 138,16]	141,22 [135,45- 143,40]*	119,45 [115,54- 125,13]	132,30 [127,78- 142,78]*	133,53 [130,48- 136,89]	177,11 [170,74- 182,84]*	120,03 [117,96- 123,62]	195,68 [184,03- 215,79] *
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] *

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 2; ИН – интактные нейроны, НХр – нейроны с хроматолизом, КТ – клетки-тени, Гл – глиоциты, МС – мелкие сосуды, ПИ – площадь инфаркта.

30 сутки эксперимента характеризовались более чем трехкратным возрастанием количества интактных нейронов в очаге, а также количества глиоцитов (на 63%), снижением количества нейронов с хроматолизом (на 90%) и количества клеток-теней (на 97%), увеличением количества мелких кровеносных сосудов (на 74%) и уменьшением площади инфаркта (на 80%).

По сравнению с группой ложнооперированных животных установлены статистически значимые ($p < 0,01$) отличия на 3 сутки эксперимента по количеству интактных нейронов, нейронов с хроматолизом и клеток-теней, количеству мелких кровеносных сосудов и площади инфаркта, на 7 сутки – по количеству интактных нейронов, нейронов с хроматолизом и клеток-теней, площади инфаркта, на 14 и 30 сутки – по количеству интактных нейронов, нейронов с хроматолизом, клеток-теней, глиоцитов, количеству мелких кровеносных сосудов и площади инфаркта.

Итак, при экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ в очаге ишемического повреждения во все сроки наблюдения увеличивается количество интактных нейронов, глиоцитов, мелких кровеносных сосудов, снижается количество нейронов с хроматолизом, клеток-теней, площадь инфаркта. Количество интактных нейронов, нейронов с хроматолизом, клеток-теней на всех сроках наблюдения частично восстанавливается, а количество мелких кровеносных сосудов с 7 суток полностью восстанавливается. При этом количество мелких кровеносных сосудов и количество глиоцитов в очаге ишемического повреждения на 14 и 30 сутки эксперимента становится больше, чем в группе ложнооперированных животных. Отметим, что в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ впервые зафиксировано увеличение количества глиоцитов в очаге ишемического повреждения, чего не наблюдалось в условиях монотерапии ЭПО или монотерапии ЛИ.

Результаты оценки экспрессии VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ представлены в таблице 28. На 3 сутки наблюдения экспрессии VEGF в очаге

статистически значимо возрастает на 59% (по медиане относительно животных с ИКГМ без терапевтического воздействия), на 7 сутки – на 54%, на 14 сутки – на 43%, на 30 сутки – на 43%. По сравнению с группой ложнооперированных животных экспрессия VEGF при ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ значимо ($p < 0,01$) возрастает во все сроки наблюдения.

Таким образом, при экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ экспрессия VEGF в очаге ишемического повреждения возрастает и становится выше, чем в группе ложнооперированных животных на 3, 7, 14 и 30 сутки наблюдения.

Таблица 28

Влияние комбинированного применения эритропоетина и лазерного излучения на экспрессию VEGF в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1-Q3], количество клеток / у.е. площади)

Группы животных	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
1. Ложно-оперированные	8,50 [7,00; 9,00]	9,50 [8,00; 10,00]	10,00 [8,75; 11,25]	10,00 [10,00; 12,00]
2. ИКГМ	13,50 [12,75; 15,0]	19,50 [18,0; 20,25]	30,00 [28,75; 31,00]	39,50 [38,00; 41,25]
5. ИКГМ + ЭПО + ЛИ	21,50 [20,75; 23,0]	32,00 [32,0; 38,0]	43,00 [41,75; 44,25]	56,50 [49,75; 59,25]
Различия (критерий Манна–Уитни)	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-5} < 0,001$ $P_{2-5} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-5} < 0,001$ $P_{2-5} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-5} < 0,001$ $P_{2-5} < 0,01$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-5} < 0,001$ $P_{2-5} < 0,001$

3.4.4 Влияние комбинированного применения эритропоетина и лазерного излучения на гематологические показатели крови при экспериментальной ишемии коры головного мозга

Первоначально исследовали влияние комбинированного применения ЭПО и ЛИ при ИКГМ на показатели «красной крови». Результаты представлены в таблице 29. На 3 сутки эксперимента в крови значимо увеличивается количество

эритроцитов на 51% (по медиане относительно группы животных с ИКГМ без терапевтического воздействия), снижается средний эритроцитарный объем на 11%, другие показатели статистически значимо не изменяются. 7 сутки наблюдения характеризуются повышением в крови количества эритроцитов (на 72%), концентрации гемоглобина (на 28%), гематокрита (на 22%), снижением среднего эритроцитарного объема (на 20%). На 14 сутки эксперимента увеличивается количество эритроцитов (на 39%), концентрация гемоглобина (на 6%), снижается средний эритроцитарный объем (на 19%). На 30 сутки эксперимента все исследуемые показатели «красной крови» статистически значимо не изменяются.

При сравнении с группой ложнооперированных животных на 3 сутки экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ значимо ($p < 0,01$) повышается гематокрит, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, на 7 сутки эксперимента повышается количество эритроцитов, снижается средний эритроцитарный объем, на 14 сутки повышается количество эритроцитов, снижается средний эритроцитарный объем, среднее содержание гемоглобина в эритроците, на 30 сутки нет значимых отличий.

Влияние комбинированного применения ЭПО и ЛИ при ИКГМ на показатели «белой крови» представлено в таблице 30. Как видно, на 3 сутки эксперимента в крови статистически значимо снижается общее количество лейкоцитов (на 25% по медиане относительно группы животных с ИКГМ без терапевтического воздействия), количество нейтрофилов (на 33%), количество моноцитов (на 20%). На 7 сутки наблюдения выявлено снижение общего количества лейкоцитов (на 61%), количества нейтрофилов (на 55%), количества моноцитов (на 62%). Аналогичные по направленности изменения зафиксированы на 14 сутки эксперимента: снижение общего количества лейкоцитов (на 33%), количества нейтрофилов (на 38%), количества моноцитов (на 36%). На 30 сутки достоверно снижается только количество нейтрофилов (на 47%). Количество тромбоцитов в крови значимо не изменяется во все сроки наблюдения.

Таблица 29

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

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО +ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО +ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО +ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО +ЛИ (n=10)
RBC, 10 ¹² /л	5,59 [4,12-7,01]	7,65 [5,74-8,91] *	5,95 [5,21-6,74]	10,24 [8,12-11,87] *	8,44 [7,81-8,97]	11,79 [10,15-12,96] *	9,02 [8,33-9,79]	9,64 [9,12-10,53]
HGB, г/л	130,7 [121,2-155,1]	148,2 [133,4-158,6]	123,2 [121,0-127,3]	158,2 [147,7-161,3] *	155,7 [151,0-157,3]	165,2 [143,1-177,4] *	162,1 [155,6-167,8]	159,4 [141,9-172,1]
HCT, %	35,2 [33,5-42,1]	39,3 [33,2-45,9]	40,1 [38,2-46,7]	48,9 [38,8-49,4]*	47,8 [44,2-49,7]	49,7 [44,2-54,8]	49,0 [46,1-50,7]	48,8 [44,2-54,9]
MCV, фл	62,96 [57,13-72,0]	55,84 [52,03-69,24] *	63,19 [57,83-74,39]	50,62 [48,24-59,16] *	55,72 [50,81-61,11]	45,18 [44,01-53,21] *	53,95 [52,01-58,81]	51,22 [48,64-54,17]
MCH, пг	22,51 [19,04-23,97]	20,37 [18,08-23,65]	18,47 [15,22-19,88]	17,88 [17,19-20,35]	18,04 [17,42-21,53]	15,14 [14,72-19,54]	18,29 [18,02-22,31]	17,21 [16,14-20,01]
MCHC, г/дл	35,13 [31,87-37,92]	36,65 [32,22-39,78]	29,13 [26,15-31,72]	32,01 [27,96-32,91]	32,52 [30,41-33,21]	34,98 [31,55-35,41]	32,99 [29,73-35,89]	33,15 [30,49-35,41]

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 1; RBC – эритроциты, HGB – гемоглобин, HCT – гематокрит, MCV – средний объем эритроцита, MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах.

Таблица 30

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

Показатели	3 сутки		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО +ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО +ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО +ЛИ (n=10)	Группа 2. ИКГМ (n=5)	Группа 5. ИКГМ+ЭПО +ЛИ (n=10)
WBC, 10 ⁹ /л	16,27 [13,37- 24,08]	12,31 [11,51- 14,01] *	28,45 [19,64- 31,42]	11,03 [9,73- 12,89] *	12,53 [11,22- 16,75]	8,48 [7,33-10,22] *	8,88 [8,02-11,46]	7,71 [5,31-9,07]
Neu, 10 ⁹ /л	3,05 [2,53- 8,27]	2,02 [1,76-2,99] *	4,74 [3,95-6,22]	2,13 [1,69-3,01] *	2,41 [1,91-2,92]	1,48 [1,21-2,11] *	1,92 [1,38-2,77]	1,49 [1,11-2,05] *
Lymph, 10 ⁹ /л	12,37 [12,01- 17,62]	9,86 [8,12-12,87] *	22,98 [18,34- 29,92]	8,55 [6,12-9,34] *	9,81 [8,21-14,02]	6,33 [5,47-7,84] *	6,67 [5,21-8,94]	5,88 [4,69-6,69]
Mon, 10 ⁹ /л	0,51 [0,46- 0,99]	0,46 [0,35-1,11]	0,47 [0,46-0,99]	0,64 [0,41-0,93]	0,41 [0,29-0,68]	0,62 [0,41-0,94]	0,31 [0,20-0,41]	0,41 [0,28-0,93]
PLT, 10 ⁹ /л	596 [554-672]	638 [589-649]	622 [595-654]	614 [572-648]	641 [605-682]	592 [541-664]	651 [583-697]	612 [579-682]

Примечание: * – значимые (p<0,01) различия с группой 2; WBC – лейкоциты, Neu – нейтрофилы, Lymph – лимфоциты, Mon – моноциты, PLT – тромбоциты.

По сравнению с группой ложнооперированных животных на 3 и 7 сутки ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ наблюдаются следующие отличия: повышение в крови общего количества лейкоцитов, количества лимфоцитов и моноцитов, на 7 и 14 сутки – повышение количества моноцитов, на 30 сутки – повышение количества нейтрофилов.

Таким образом, 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 эксперимента. 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 7 сутки восстанавливаются частично, а на 14 и 30 сутки эксперимента – полностью.

Полученные нами результаты при экспериментальной ИКГМ в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ в целом являются отражением отмеченного в разделах 3.2 и 3.3 нейропротекторного действия как ЭПО, так и ЛИ по отдельности и демонстрируют синергичный эффект ЭПО и ЛИ, применяемых в комбинации. Так, частичное или полное восстановление неврологического и этологического статуса связаны с улучшением микроциркуляции, увеличением количества мелких кровеносных сосудов в очаге ишемического повреждения, в том числе в связи с повышением экспрессии VEGF и активацией неоангиогенеза. Улучшение кислородообеспечения зоны ишемического повреждения головного мозга приводит к увеличению *in situ* количества интактных нейронов и глиоцитов, снижению количества поврежденных нейронов (с хроматолизом, клеток-теней), сокращению площади инфаркта. Уменьшение площади основной зоны ишемии, а также зоны пенумбры приводит к снижению выраженности системных гематологических проявлений, прежде всего нейтрофильного лейкоцитоза, а также восстановлению количества

эритроцитов и эритроцитарных индексов, в том числе за счет эритропоэтического эффекта ЭПО.

Выводы по разделу 3.4

1. При экспериментальной ИКГМ в условиях 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 суток полностью восстанавливается ориентировочно-исследовательское поведение животных; показатель микроциркуляции увеличивается во все сроки наблюдения и полностью восстанавливается на 14 и 30 суток эксперимента.

2. 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, снижается количество нейронов с хроматолизом, клеток-теней, 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 больше, чем в группе ложнооперированных животных.

3. 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 суток – полностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ишемический инсульт и другие цереброваскулярные заболевания представляют серьезную медико-социальную проблему как в РФ, так и в мире. Заболеваемость ишемическим инсультом не имеет тенденции к снижению, вносит существенный вклад в смертность и инвалидизацию населения.

В последние годы достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов ишемического и реперфузионного повреждения нейронов. Сначала церебральная ишемия различной продолжительности вызывает нарастающее нарушение функциональной активности, а затем структуры нейронов вплоть до гибели путем некроза или апоптоза. В частности, при гипоксии активация анаэробного гликолиза и внутриклеточный лактат-ацидоз приводят к цитотоксическому отеку, нарушению функции ионных насосов цитоплазматической мембраны, активации процессов свободнорадикального окисления. Указанные изменения прогрессируют при абсолютном энергодефиците, приводящем к необратимому электролитному дисбалансу и гибели нейронов. Важным механизмом повреждения нейронов выступает глутаматная эксайтотоксичность, когда в условиях энергодефицита возникает деполяризация пресинаптической мембраны аксонов, нарушается ионный транспорт, сопряженный с глутаматом и аспартатом, что приводит к высвобождению глутамата и аспартата из нервных окончаний и запуску глутамат-кальциевого каскада, повышению концентрации свободного кальция в цитоплазме и активации кальций-зависимых процессов.

Активация процессов свободнорадикального окисления является еще одним ключевым механизмом повреждения нейронов при церебральной ишемии–реперфузии, запускаемая лактат-ацидозом, а также активацией и продукцией АФК нейтрофилами из периферической крови после реперфузии, эндотелиоцитами через систему ксантиноксидаза/ксантиндегидрогеназа в условиях гипоксии. Активация СРО через индукцию ПОЛ вызывает повреждение цитоплазматической мембраны и мембран органелл нейрона, в том числе

митохондриальной, формируя порочный круг гипоксии нейронов. Еще один механизм постишемической дисфункции и деструкции нейронов – это нарушение функции астроглии, которая в норме участвует в трофике, ионном гомеостазе, синтезе ЭПО, VEGF и других веществ, обеспечивает захват и метаболизм глутамата и аспартата, препятствуя глутаматной эксайтотоксичности, обладает антиоксидантной активностью, формирует межклеточную кооперацию в системе глия–нейроны–эндотелий.

Указанные механизмы, кроме изменения метаболизма, функции, структуры и жизнеспособности нейронов, отрицательно влияют на кардиоваскулярный блок в ЦНС, приводят к дисфункции и повышению проницаемости ГЭБ, вазогенному отеку и геморрагической трансформации [135]. Одновременно в тканях головного мозга в условиях гипоксии активируются HIF-1 альфа-опосредованные изменения метаболизма: синтез и секреция VEGF, ангиопоэтина, ЭПО и других факторов, участвующих в ангиогенезе и неоваскуляризации [167, 302, 303]. В условиях гипоксии VEGF экспрессируется на повышенном уровне. ЭПО по большей части синтезируется в почках в ответ на гипоксию, кроме этого, астроциты в условиях гипоксии увеличивают экспрессию мРНК ЭПО. В условиях гипоксии на нейронах повышается экспрессия рецепторов к ЭПО и VEGF, что является предпосылкой для их применения с целью нейропротекции при поражениях головного мозга [208].

ЭПО играет значимую роль в эмбриогенезе нервной ткани, имеет большое значение в поддержании функции и восстановлении нервной ткани при инфекционных, аутоиммунных, токсических воздействиях, дегенеративных изменениях, а также ишемических поражениях ЦНС. Различные режимы лазерной терапии низкоинтенсивного диапазона применяются в неврологии, в том числе при цереброваскулярной патологии. Однако механизм действия ЭПО и ЛИ при ишемических поражениях ЦНС до конца не ясен, что требует проведения дальнейших исследований, в том числе в условиях комбинированного применения ЭПО и ЛИ.

Нейропротекция в настоящее время рассматривается как «Святой Грааль» в терапии острого ишемического инсульта за счет защиты нейронов, во-первых, от гипоксического повреждения до реперфузии, во-вторых, от реперфузионных повреждений [236]. Основной мишенью для нейропротекции в очаге ишемического повреждения головного мозга является зона пенумбры. Максимальное значение для эффективности нейропротективных мероприятий имеет время их применения: они должны применяться как можно раньше, в идеале в первые 3–6 часов от первых симптомов, что позволит воздействовать не только на область пенумбры, но и на «ядро» ишемии, ограничивая степень и глубину повреждения нейронов. Для первичной нейропротекции (в течение 6–12 часов от начала ишемии мозга) применяют такие фармакологические агенты, как магнезия, лубелузол, глицин и др. При вторичной нейропротекции (от 12 часов до 7 суток от начала ишемии мозга) показали эффективность эмоксин, мексидол, семакс и др. Однако большинство исследователей сходятся во мнении, что эффективность нейропротективных подходов при ишемических повреждениях мозга оставляет желать лучшего и необходима разработка и обоснование применения новых подходов, в том числе при их комбинации.

Нами выполнено исследование по изучению нейропротекторной роли ЭПО, ЛИ, а также их комбинации при экспериментальной ИКГМ. Прежде всего необходимо отметить, что применяемая нами для оценки нейропротективного влияния ЭПО и ЛИ экспериментальная модель ИКГМ, индуцированная диатермокоагуляцией пиальных сосудов поверхности коры головного мозга в области задних отделов левой лобной доли и передних отделов левой теменной доли головного мозга (прецентральные и постцентральные извилины левого полушария головного мозга, которые кровоснабжаются ветвями средней мозговой артерии и чаще всего поражаются при ишемических инсультах головного мозга у людей), является адекватной и морфологически верифицирована.

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 повреждения головного мозга позволил установить, что от 3 к 30 суткам эксперимента наблюдается снижение количества интактных нейронов, увеличение количества мелких кровеносных 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 кровеносных 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 головном мозге 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 флуориметрии установлено снижение микроциркуляции в очаге ИКГМ, показатель частично восстанавливается к 30 суткам эксперимента. Таким образом, облитерация пияльных сосудов и снижение кровотока в коре головного мозга позволили моделировать морфологические и клинические признаки фокальной ишемии.

Наличие в ЦНС очага ишемического повреждения приводит к системным гематологическим эффектам. Так, по показателям «белой крови» 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, 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.

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 и 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 приводит к меньшей выраженности системных гематологических проявлений при экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЭПО – лейкоцитоза и коррекции снижения количества эритроцитов и концентрации гемоглобина. 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 эритропоэтического 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 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 [94, 103, 180].

1. Известный эритропоэтический эффект ЭПО на клетки-предшественники эритроидного ростка костного мозга, где ЭПО стимулирует пролиферацию, дифференцировку и ограничивает апоптоз, что приводит к увеличению продукции эритроцитов, количества эритроцитов в крови и кислородной емкости

крови. Улучшение кислородобеспечения нейронов обеспечивает реализацию их функциональной активности и снижает гибель клеток в очаге ишемического повреждения головного мозга.

2. Прямой нейропротекторный эффект ЭПО.

(а) Установлена способность ЭПО угнетать апоптоз нейронов в условиях его активации при церебральной ишемии, гипоксии нейронов, дефиците факторов роста. Так, ЭПО ускоряет восстановление когнитивной функции и препятствует атрофии головного мозга после экспериментального повреждения головного мозга у мышей [258, 259]. ЭПО блокирует гибель нейронов путем апоптоза в очаге ишемии за счет дифференцированной регуляции экспрессии про- и антиапоптогенных генов (Bcl-2, Bcl-XL, Bax и DP5) [187]. В эксперименте при ишемическом инсульте (30-минутная окклюзия средней мозговой артерии с последующей реперфузией) с использованием самцов Faим2-дефицитных мышей показано, что ЭПО уменьшает гибель нейронов в очаге повреждения [186]. Эффект ЭПО более выражен в разовой дозе 5 000 ЕД/кг (трехкратно) по сравнению с дозой 90 000 ЕД/кг и опосредован стимуляцией фосфатинозитол-3-киназа/Akt пути (PI3K/Akt), который регулирует экспрессию Faим2.

(б) ЭПО стимулирует функцию нейронов и улучшает их жизнеспособность через активацию кальциевых каналов и высвобождение нейромедиаторов. Возникает вполне закономерный вопрос о механизме возможного прямого нейротропного действия ЭПО, учитывая, что ЭПО – это крупные молекулы массой 34 кДа, которые обычно не пересекают гематоэнцефалический барьер. Однако в отношении ЭПО принято считать, что он способен проникать через гематоэнцефалический барьер с помощью специфических рецепторов на поверхности эндотелиоцитов церебральных сосудов [117]. Указанные рецепторы для ЭПО экспрессируются в физиологических условиях и в гораздо большей степени – в условиях церебральной ишемии. Так, при экспериментальном ишемическом инсульте максимальная экспрессия ЭПО на ранних этапах выявляется в области пенумбры и в меньшей степени в области «ядра» инфаркта, позднее – преимущественно в реактивных астроцитах и в меньшей степени в

капиллярах пенумбры [229]. Показано, что эффекты ЭПО в нервной ткани, по крайней мере, частично зависят от ее прайминга провоспалительными цитокинами, например, TNF-альфа [280, 281]. Интересно, что наличие в очаге ишемического повреждения таких провоспалительных цитокинов, как TNF-альфа, усиливает защитные эффекты ЭПО и VEGF на нейроны после ишемического повреждения [272].

(в) ЭПО активирует созревание и дифференцировку олигодендроглии и пролиферацию астроцитов, а также оказывает антиапоптотический эффект на клетки микроглии [269].

3. Учитывая, что ведущим механизмом нарушения неврологического статуса при ИКГМ является ограничение кровотока в коре головного мозга в области кровоснабжения средней мозговой артерии (пре- и постцентральная извилины), необходимо отметить способность ЭПО стимулировать неоангиогенез. В церебральных капиллярах имеется большое количество рецепторов к ЭПО. Выявлена способность ЭПО дозозависимо стимулировать митоз эндотелиальных клеток [293].

4. Антиоксидантный эффект ЭПО в нервной ткани. ЭПО является антагонистом глутамата, увеличивает активность антиоксидантных ферментов, регулирует продукцию нейромедиаторов, тормозит NO-зависимые свободнорадикальные процессы [216, 247]. ЭПО ингибирует гипоксия-индуцированную активацию NMDA-рецепторов, снижая тем самым эксайтотоксичность и активацию кальций-глутаматного каскада. ЭПО приводит к истощению запасов железа, в условиях активации эритропоэза основным потребителем которого выступают эритроидные клетки-предшественники костного мозга. Дефицит железа является фактором ограничения реакций свободнорадикального окисления и повреждения нейронов, особенно в момент реперфузии.

5. Противовоспалительный эффект ЭПО. Один из механизмов нейропротекторного действия ЭПО при ишемии головного мозга связан с повышением экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 и активации

пролиферативных процессов и неоангиогенеза на этапе восстановления тканей [302, 303]. Ранее Осиковым М. В. и соавторами зафиксированы нейропротекторные эффекты ЭПО в отношении когнитивного и психофизиологического статуса, функциональной активности вегетативной нервной системы у больных с терминальной стадией хронической болезни почек [53, 55]. ЭПО при ХПН проявляет противовоспалительную активность – снижает концентрацию провоспалительных цитокинов, лабораторные признаки системного воспалительного ответа.

Однако следует учитывать, что применение ЭПО как нейропротекторного агента при церебральной ишемии значительно ограничивают побочные эффекты, прежде всего, развитие артериальной гипертензии и тромбозов через 2–16 недель после применения, причем независимо от количества эритроцитов в крови, а в связи с увеличением концентрации внутриклеточного кальция и снижения продукции оксида азота (II) [277]. В этом отношении интерес могут представлять препараты карбамилированного ЭПО, который не взаимодействует с классическим ЭПО-рецептором, но сохраняет цитопротекторные свойства [136].

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 начиная с 7 суток, исследовательская активность – на 30 сутки. Таким образом, восстановление неврологического статуса наступает позднее по сравнению с эффектом применения ЭПО при ИКГМ.

При экспериментальной ИКГМ в условиях применения ЛИ в очаге повреждения во все сроки наблюдения увеличивается количество интактных нейронов, экспрессия VEGF, снижается – нейронов с хроматолизом и клеточных теньей; 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 мозга на более поздних этапах.

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 «красной крови» 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.

1. Стимуляция неоангиогенеза в нервной ткани за счет повышения экспрессии VEGF, что наиболее выражено в эндотелиоцитах мелких кровеносных сосудов [16, 17, 19, 20, 139, 153].

2. Активация метаболизма и предотвращение гибели нейронов и астроглии в очаге повреждения [220]. ЛИ через изменение состояния цитоплазмы нейронов (переход цитогеля в цитозоль) и повышение концентрации Ca^{2+} приводит к активации Ca^{2+} -зависимых ферментов, синтезу факторов роста и других цитокинов [47, 48]. Для ускорения нейропластических процессов после ишемии ЦНС имеет значение улучшение дренирования ликвора после лазеротерапии [244, 245].

3. Активация функции митохондрий и утилизации кислорода в нейронах [159]. В том числе в связи с повышением активности ферментов дыхательной цепи, а также опосредованно через повышение деформабильности эритроцитов, сродства гемоглобина к кислороду, через уменьшение вязкости крови и как следствие улучшение доставки кислорода в очаг ишемического повреждения мозга.

4. Полагают, что применение ЛИ после церебральной ишемии ограничивает воспалительный процесс, инфильтрацию очага лейкоцитами, площадь вторичной альтерации (пенумбры) [253]. Возможно, это связано с антиоксидантным эффектом ЛИ, фиксируемым по снижению содержания МДА, повышению

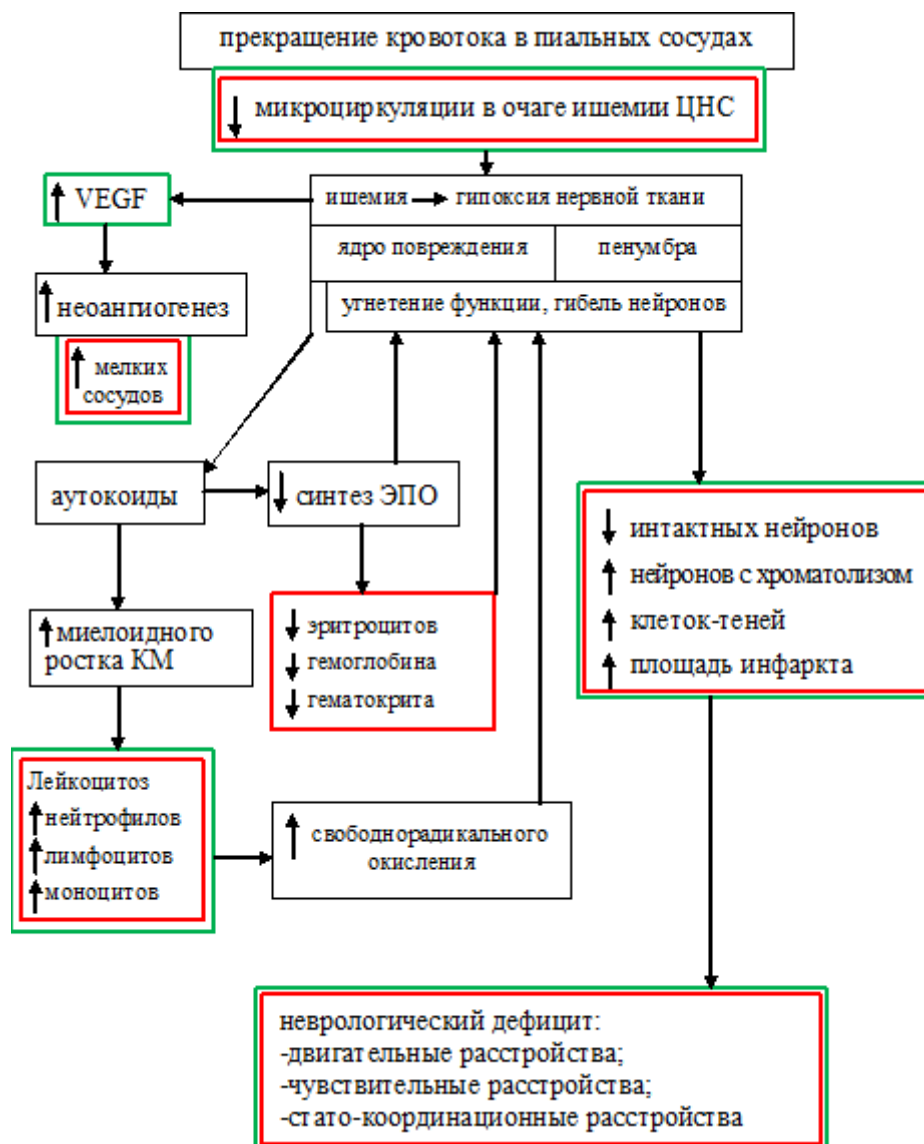
активности ферментов антиокислительной защиты – СОД, каталазы, глутатионпероксидазы [179].

Учитывая нейропротекторный эффект ЭПО и ЛИ как монотерапии при ИКГМ, мы провели исследование эффективности комбинированного применения ЭПО и ЛИ. 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. Итак, неврологический статус и микроциркуляция в очаге ишемии восстанавливаются в те же сроки, что и в условиях монотерапии ЭПО, но не ЛИ.

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, снижается количество нейронов с хроматолизом, клеток-теней, 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 мелких 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. Итак, системные гематологические изменения при ИКГМ корригируются уже на 3 сутки эксперимента для «красной крови» 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 9). Как видно, общим в механизме нейропротекторного действия как ЭПО, так и ЛИ выступает 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 эритропоэтический эффект – увеличение количества эритроцитов, концентрации гемоглобина в крови, а для ЛИ – повышение экспрессии VEGF в очаге повреждения.



ВЫВОДЫ

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

2. При экспериментальной ишемии коры головного мозга показатель неврологического статуса по шкале Garcia J. H. снижается по мере снижения в крови количества эритроцитов, концентрации гемоглобина, повышения количества лейкоцитов, нейтрофилов.

3. Применение эритропоэтина при экспериментальной ишемии коры головного мозга 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 увеличивается число интактных нейронов, мелких кровеносных сосудов, снижается количество нейронов с хроматолизом и клеток-теней, площадь инфаркта, не изменяется экспрессия VEGF.

4. Эритропоэтин при экспериментальной ишемии коры головного мозга 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 лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга 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 ишемии коры головного мозга 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 ишемии коры головного мозга в условиях комбинированного применения эритропоэтина и лазерного излучения 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 ишемического повреждения повышается количество интактных нейронов, глиоцитов, мелких кровеносных сосудов, экспрессия VEGF, снижается площадь инфаркта, количество нейронов с хроматолизом и клеток-теней.

8. Комбинированное применение эритропоэтина и лазерного излучения при экспериментальной ишемии коры головного мозга полностью восстанавливает в крови с 3 суток количество эритроцитов, концентрацию гемоглобина, с 14 суток – общее количество лейкоцитов и нейтрофилов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АКТГ – адренокортикотропный гормон
- АМФ – аденозинмонофосфат
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ГМ – головной мозг
- ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ИКГМ – ишемия коры головного мозга
- ИЛ – интерлейкин
- ИНФ – интерферон
- КОЕ-Э – колониеобразующая единица для эритроцитов
- КТ – компьютерная томография
- ЛДФ – лазерная доплеровская флуориметрия
- ЛИ – лазерное излучение
- МДА – малоновый диальдегид
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- НАД – никотинамидадениндинуклеотид
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- СОД – супероксиддисмутаза
- СРО – свободнорадикальное окисление
- ТНФ – фактор некроза опухоли
- ХПН – хроническая почечная недостаточность
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭПО – эритропоэтин
- СО₂-лазер – углекислотный лазер

Nd:YAG-лазер – неодимовый лазер (лазер на алюмоиттриевом гранате с неодимом)

NMDA-рецептор – N-метил-D-аспартат связывающий рецептор к глутамату

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин, И.П. Нейрохимия / И.П. Ашмарин, П.В. Стукалов. – Москва: Изд-во Ин-та биомедицинской химии РАМН, 1996. – 165с.
2. Базарный, В.В. Характеристика эритрона у доноров крови / В.В. Базарный, Н.В. Гаренских // Вестн. Уральской мед. академической науки. – 2014. – № 3 (49). – С. 91-92.
3. Бакшеев, В.И. Эритропоэтин в клинической практике: прошлое, настоящее и будущее (обзор литературы) / В.И. Бакшеев, Н.М. Колomoец // Клиническая медицина. – 2007. – №9. – С. 30-37.
4. Баранова, О.А. Поиск новых маркеров окислительного стресса при ишемии мозга для оптимизации терапевтических подходов / О.А. Баранова, А.В. Чеканов, А.Н. Карнеев [идр.] // Журн. Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2011. – №12. – С. 25-31.
5. Белкин, А.А. Инсульт: клинико-организационное руководство / А.А. Белкин, Л.И. Волкова, И.Н. Лейдерман. – Екатеринбург, 2004. – 135 с. –(Серия «Неврология. Интенсивная терапия»).
6. Белкин, А.А. Современные аспекты эпидемиологии, патофизиологии, этиологии и классификации инсульта / А.А. Белкин, Л.И.Волкова // Уральский мед. журн. – 2005. – №1. – С. 2-10.
7. Бельская, Г.Н. Современные возможности повышения эффективности терапии ишемического инсульта / Г.Н. Бельская, Е.И. Лузанова, Л.Д. Макарова [и др.] // Мед. совет. – 2015. – №18. – С. 18-22.
8. Бельская, Г.Н. Влияние нейропротективной терапии на течение церебрального инсульта / Г.Н. Бельская, Н.В. Пизова, М.А. Соколов [и др.] // Мед. совет. – 2016. – №11. – С. 26-31.
9. Бельская, Г.Н. Эффективная нейрорепарация на первом этапе восстановления больных с ишемическим инсультом / Г.Н. Бельская, М.А. Соколов, И.А. Измайлов// Поликлиника. Спецвып. «Неврология. Ревматология». – 2017. – №3. – С. 23-26.

10. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон. – Москва: Высш. шк., 1991. – 399 с.
11. Верещагин, Н.В. Инсульт: принципы диагностики, лечения и профилактики / Н.В. Верещагин, М.А. Пирадов, З.А. Суслина. – Москва: Интермедика, 2002. – 208 с.
12. Виленский, Б.С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение / Б.С. Виленский. – Санкт-Петербург: Фолиант, 2002. – 397с.
13. Волчегорский, И.А. Антигипоксическое действие производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты и их ноотропный эффект при аллоксановом диабете / И.А. Волчегорский, Л.М. Рассохина, И.Ю. Мирошниченко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т.74, №12. – С. 27-32.
14. Волчегорский, И.А. Церебропротективное действие производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты при экспериментальном сахарном диабете / И.А. Волчегорский, Л.М. Рассохина, И.Ю. Мирошниченко // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – №6. – С. 50-61.
15. Гистологическая техника: учебное пособие / В.В. Семченко, С.А.Барашкова, В.Н.Ноздрин[и др.]. – 3-е изд., доп. и перераб. – Омск; Орел: Омская обл.типография, 2006. – 290 с.
16. Головнева, Е.С. Механизм универсальной активации неоангиогенеза после воздействия высокоинтенсивного лазерного излучения на ишемизированные ткани / Е.С. Головнева // Вест. новых мед. технологий. – 2003. – Т.10, №1-2. – С. 15-17.
17. Головнева, Е.С. Механизмы формирования нового сосудистого русла в ответ на высокоинтенсивное лазерное воздействие / Е.С. Головнева, Г.К. Попов // Обоснование применения лазерных технологий в хирургии (экспериментальные исследования с внедрением их в клиническую практику) / под ред. А.И. Козеля, Р.У. Гиниатуллина, Е.С. Головневой [и др.]. – Челябинск: Пирс, 2009. – С. 125-165.

18. Головнева, Е.С. Применение системного высокоинтенсивного лазерного облучения в лечении пациентов с ишемическими синдромами / Е.С. Головнева, В.Р. Талипова, А.О. Гужина [и др.] // Лазерная медицина. – 2011. – Т.15, №2. – С. 52-а.
19. Головнева, Е.С. Локальные эффекты системного лазерного облучения повышенной мощности / Е.С. Головнева, Т.Г. Кравченко, М.Г. Кудрина [и др.] // Вестн. Уральской мед. академической науки. – 2012. – №2 (39). – С. 126-127.
20. Головнева, Е.С. Динамика репаративных процессов в миокарде после лазерного облучения зон локализации красного костного мозга / Е.С. Головнева, В.Р. Рейдман, Т.Г. Кравченко // Лазерная медицина. – 2014. – №2. – С. 36-39.
21. Гусев, Е.И. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной ишемии / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, А.В. Коваленко [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1999. – №2. – С. 65-70.
22. Гусев, Е.И. Современные представления о лечении острого церебрального инсульта / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова // Consilium Medicum. – 2000. – Т.2, №2. – С. 60-65.
23. Гусев, Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. – Москва: Медицина, 2001. – 328 с.
24. Гусев, Е.И. Проблема инсульта в России / Е.И. Гусев // Инсульт : прил. к Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2003. – №9. – С. 3-10.
25. Гусев, Е.И. Церебральный инсульт: проблемы и решения / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, М.Ю. Мартынов [и др.] // Вестн. РГМУ. – 2006. – №4. – С. 28-32.
26. 10 ведущих причин смерти в мире [Электронный ресурс] // Информационный бюллетень ВОЗ. – 2013. – №310. – Режим доступа: <http://vseruss.com/index.php?catId=2&newsId=7874&p=4> (дата обращения : 07.05.2018).
27. Дунаев, А.В. Контроль поглощаемой в эпидермисе мощности излучения при низкоинтенсивной лазерной терапии / А.В. Дунаев, С.Ф. Корндорф // Вестн. новых мед. технологий. – 2002. – №4. – С. 63-65.

28. Занин, С.А. Гистологическое обоснование эффективности ТЭС-терапии при экспериментальном ишемическом инсульте [Электронный ресурс] / С.А. Занин, А.Х. Каде, А.И. Трофименко [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №1 (часть 1). – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17839> (дата обращения: 17.03.2018).
29. Захаров, С.Д. Светоокислородный эффект – физический механизм активации биосистем квазимонохроматическим излучением [Электронный ресурс] / С.Д. Захаров, А.В. Иванов. – Москва, 2006. – 50 с. – Режим доступа : http://preprints.lebedev.ru/wp-content/uploads/2011/12/2006_1.pdf (дата обращения : 07.05.2018)
30. Захаров, Ю.М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина / Ю.М. Захаров // Рос. физиологический журн. – 2007. – №6. – С. 592-608.
31. Зинькова, Н.Н. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на динамику морфологических изменений в головном мозге крыс после ишемического инсульта / Н.Н. Зинькова, Е.Г. Гилерович, И.Б. Соколова [и др.] // Цитология. – 2007. – Т.49, №11. – С. 923-932.
32. Игнатьева, Е.Н. Механизмы взаимодействия высокоинтенсивного лазерного излучения с биологическими тканями / Е.Н. Игнатьева, Е.С. Головнева // Обоснование применения лазерных технологий в хирургии (экспериментальные исследования с внедрением их в клиническую практику) / под ред. А.И. Козеля, Р.У. Гиниатуллина, Е.С. Головневой [и др.]. – Челябинск: Пирс, 2009. – С. 7-14.
33. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / под ред. З.А. Суслиной, М.А. Пирадова. – Москва: МЕДпресс-информ, 2008. – 283с.
34. Калуев, А.В. Этологический анализ груминга при стрессе [Электронный ресурс] / А.В. Калуев. – Режим доступа: <http://entology.ru/library/?id=237> (дата обращения: 02.06.2014).
35. Кару, Т.Й. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром-с-оксидазы / Т.Й. Кару // Современные лазерно-информационные и лазерные технологии / под ред. В.Я. Панченко, В.С. Голубева. – Москва: Интерконтакт Наука, 2005. – С. 131-143.

36. Клебанов, Г.И. Первичные и вторичные молекулярно-клеточные механизмы квантовой терапии оптического диапазона спектра / Г.И. Клебанов // Проблемы физической биомедицины. – Саратов, 2003. – С. 42-52.
37. Клиническая патофизиология: курс лекций / под ред. В.А. Черешнева, П.Ф. Литвицкого, В.Н. Цыгана. – 2-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – 472 с.
38. Корочкин, И.М. Применение гелий-неонового лазера в клинике внутренних болезней / И.М. Корочкин, Т.М. Романова, Г.М. Капустина // Советская медицина. – 1984. – №2. – С. 6-10.
39. Кравченко, Т.Г. Оценка глубины проникновения лазерного излучения при терапевтическом воздействии методом компьютерного моделирования / Т.Г. Кравченко, А.С. Зарезина, Е.С. Головнева // Вестн. новых мед. технологий. – 2007. – Т.14, №2. – С. 202- 204.
40. Лазеры в клинической медицине: рук. для врачей / под ред. С.Д. Плетнева. – Москва: Медицина, 1981. – 400 с.
41. Лебедева, Е.А. Эффекты эритропоэтина в клинике и эксперименте / Е.А. Лебедева, А.Д. Беляевский, М.Е. Белоусова // Фундаментальные исследования. – 2012. – №10-1. – С. 157-161.
42. Ломако, В.В. Влияние общего охлаждения на поведение крыс в «открытом поле» / В.В. Ломако, А.В. Шило // Пробл. криобиологии. – 2009. – Т. 19, №4. – С. 421-430.
43. Луцкий, М.А. Анализ эффективности мексидола в комплексном лечении больных с ишемическим инсультом / М.А. Луцкий // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2010. – №4. – С. 57-59.
44. Мачнева, Т.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения синего, зеленого и красного диапазонов на свободно-радикальные процессы в крови крыс при экспериментальном эндотоксическом шоке / Т.В. Мачнева, Н.В. Космачева, Ю.А. Владимиров [и др.]// Биомедицинская химия. – 2013. – Т. 59, вып. 4. – С. 411-424.

45. Минаев, В.П. Современные скальпели на основе полупроводниковых и волоконных лазеров – качественно новый инструмент для хирургии и силовой терапии / В.П. Минаев // Новые лазерные технологии. – 2004. – Т. 11, № 4. – С. 8-13.
46. Москвин, С.В. Внутривенное лазерное облучение крови / С.В. Москвин, Г.А. Азизов. – Москва: НПЛЦ "Техника", 2003. – 32 с.
47. Москвин, С.В. К вопросу о механизмах терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения / С.В. Москвин // Вестн. новых мед. технологий. – 2008. – №1. – С. 166-172.
48. Москвин, С.В. Эффективность лазерной терапии / С.В. Москвин. – Москва; Тверь: Триада, 2014. – 896 с.: 202 ил. – (Серия «Эффективная лазерная терапия»; т.2).
49. Мусиенко, Ю.И. Состояние кислородно-транспортной функции крови у больных ишемическим инсультом при лазерной гемотерапии / Ю.И. Мусиенко // Мед. новости. – 2007. – №1. – С. 121-124.
50. Неврология: нац. рук. / под ред. Е.И. Гусева. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 1035 с.
51. Нечипуренко, Н.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, Ю.И. Мусиенко // Мед. новости. – 2008. – №1. – С. 7-13.
52. Онищенко, Л.С. Изменения в очаге экспериментального ишемического инсульта под воздействием нейропротективных препаратов / Л.С. Онищенко, О.Н. Гайкова, С.Н. Янишевский // Морфология. – 2006. – №6. – С. 40-46.
53. Осиков, М.В. Патофизиологический анализ влияния эритропоэтина на психологический статус у больных с хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе / М.В. Осиков, К.В. Ахматов, Л.В. Кривохижина // Вестн. Южно-Уральского гос. ун-та. – 2010. – №19. – С. 110-116. – (Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура»).
54. Осиков, М.В. Влияние эритропоэтина на активность системы плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности / М.В. Осиков,

Т.А. Григорьев // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т.153, №1. – С. 27-30.

55. Осиков, М.В. Плейотропные эффекты эритропоэтина при хронической почечной недостаточности[Электронный ресурс] / М.В. Осиков, В.Ю. Ахматов, Л.Ф. Телешева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – №7-1. – Режим доступа: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31817> (дата обращения : 07.05.2018).

56. Осиков, М.В. Влияние эритропоэтина на показатели врожденного иммунитета в экспериментальных условиях *in vitro* [Электронный ресурс] / М.В. Осиков, Л.Ф. Телешева, К.С. Ожиганов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №1. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12138> (дата обращения : 07.05.2018).

57. Осиков, М.В. Влияние эритропоэтина на процессы свободнорадикального окисления и экспрессию гликопротеинов в тромбоцитах при хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, №1. – С. 30-33.

58. Осиков, М.В. Антиоксидантный эффект эритропоэтина в лимфоцитах периферической крови при экспериментальной термической травме / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, О.Т. Саедгалина // Рос. иммунологический журн. – 2015. – Т.9 (2), №2 (18). – С. 74-76.

59. Осиков, М.В. Влияние эритропоэтина на количественный состав и апоптоз лимфоцитов периферической крови в динамике экспериментальной термической травмы/ М.В. Осиков, Е.В. Симонян, О.Т. Саедгалина // Рос. иммунологический журн. – 2015. – Т.10 (19), №2 (1) (18). – С. 479-481.

60. Осиков, М.В. Влияние эритропоэтина на содержание продуктов перекисного окисления липидов в лимфоцитах при экспериментальной термической травме / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, О.Т. Саедгалина // Казанский мед. журн. – 2015. – Т. 96, №5. – С. 849-853.

61. Осиков, М.В. Механизм влияния эритропоэтина на количественный состав лимфоцитов в крови при экспериментальной термической травме [Электронный

ресурс] / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, О.Т. Саедгалина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №2. – Режим доступ:<https://science-education.ru/ru/article/view?id=24275> (дата обращения: 04.05.2018).

62. Осиков, М.В. Влияние парентерального применения эритропоэтина на функциональную активность нейтрофилов периферической крови при экспериментальной термической травме / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, О.Т. Саедгалина [и др.] // Журн. научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». – 2017. – Т.19, №1. – С. 100-103.

63. Осиков, М.В. Показатели апоптоза лимфоцитов периферической крови при экспериментальной термической травме в условиях применения трансдермальной пленки с эритропоэтином / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, О.Т. Саедгалина [и др.] // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». – 2017. – Т. 19, №1. – С. 104-108.

64. Пирадов, М.А. Нейропротекция при цереброваскулярных заболеваниях: поиск жизни на Марсе или перспективное направление лечения? Часть 1. Острые нарушения мозгового кровообращения / М.А. Пирадов, М.М. Танащян, М.А. Домашенко [и др.] //Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2015. – Т. 9, №1. – С. 41-50.

65. Попов, Г.К. Прикладной аспект механизма действия лазерного излучения на морфофункциональные свойства клетки / Г.К. Попов, Е.С. Головнева // Мед. наука и образование Урала. – 2008. – №2. – С. 63-65.

66. Прикладная лазерная медицина: учебное и справочное пособие / под ред. Х.П. Берлиена, Г.Й. Мюллера; пер. с нем. под ред. Н.И. Коротеева, О.С. Медведева. – Москва: Интерэксперт, 1997. – 345 с.

67. Российский статистический ежегодник. 2017: стат. сб. / Росстат. –Москва, 2017. – 686 с.

68. Румянцева, С.А. Антиоксидантная терапия при остром ишемическом инсульте / С.А. Румянцева, В.Н. Евсеев, Е.В. Елисеев // Атмосфера. Нервные болезни. – 2009. – №3. – С. 8-12.

69. Самойленкова, Н.С. Защитный эффект preconditionирования при фокальной ишемии мозга; роль атф-зависимых калиевых каналов: дис. ... канд. биол. наук / Н.С. Самойленкова. – Москва, 2008. – 182 с.
70. Сергеев, Д.В. Новые возможности нейропротекции при ишемическом инсульте / Д.В. Сергеев, М.А. Пирадов, М.Ю. Максимова [и др.] // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2011. – №4. – С. 56-63.
71. Силачев, Д.Н. Изучение новых нейропротекторов на модели фокальной ишемии головного мозга: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Д.Н. Силачев. – Москва, 2009. – 23 с.
72. Скворцова, В.И. Высокая эффективность селективного внутриартериального тромболизиса при лечении ишемического инсульта у больных с окклюзией артерий крупного калибра / В.И. Скворцова, Г.Н. Голухов, Ю.Д. Волинский [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2006. – №12. – С. 32-40.
73. Скворцова, В.И. Системная тромболитическая терапия при ишемическом инсульте / В.И. Скворцова, Г.Н. Голухов, Л.В. Губский [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2006. – №12. – С. 24-31.
74. Скворцова, В.И. Результаты внедрения тромболитической терапии при ишемическом инсульте в Российской Федерации / В.И. Скворцова, Н.А. Шамалов, К.В. Анисимов [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2010. – Т. 110, №12, вып. 2. Инсульт. – С. 17- 22.
75. Скоромец, А.А. Новые возможности нейропротекции в лечении ишемического инсульта / А.А. Скоромец, Л.В. Стаховская, А.А. Белкин [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2008. – Т. 108, №S22. – С. 32-38.
76. Скоромец, А.А. Многофакторная нейропротекция при ишемическом инсульте (клинико-экспериментальное исследование) / А.А. Скоромец, Е.В. Мельникова, И.В. Чурилова [и др.] // Врач. – 2009. – №2. – С. 26-29.

77. Спасов, А.А. Механизм гипокоагуляционного действия низкоэнергетического лазерного излучения / А.А. Спасов В.В. Недогода, Куаме Конан // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 1998. – №7. – С. 36-38.
78. Способ лечения стенозирующих заболеваний периферических сосудов: пат. 2292925 Рос. Федерация / А.О. Гужина, Е.С. Головнева, В.Э. Гужин, Е.Н. Игнатьева, А.А. Фокин, А.И. Козель, М.Г. Баранова. – №2004138436/14; заявл. 10.06.2006; опубл. 10.02.2007, Бюл. №4.
79. Способ стимуляции выхода стволовых клеток из костного мозга в периферическое кровяное русло: пат. 2305573 Рос. Федерация / Е.С. Головнева, А.О. Гужина, Е.Н. Игнатьева, В.Э. Гужин, Т.Г. Кравченко, А.И. Козель. – №2004138434/14; заявл. 10.06.2006; опубл. 10.09.2007, Бюл. №25
80. Стародубцева, О.С. Анализ заболеваемости инсультом с использованием информационных технологий [Электронный ресурс] / О.С. Стародубцева, С.В. Бегичева // Фундаментальные исследования. – 2012. – №8 (часть 2). – С. 424-427. – Режим доступа: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=30383>(дата обращения: 07.05.2018).
81. Судаков, С.К. Физиология. Определение уровня тревожности у крыс: расхождение результатов в тестах «открытое поле», «крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля / С.К. Судаков, Г.А. Назарова, Е.В. Алексеева // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.155, №3. – С. 268-271.
82. Суслина, З.А. Принципы лечения острых ишемических нарушений мозгового кровообращения / З.А. Суслина, М.А. Пирадов, М.М. Танашян // Очерки ангионеврологии / под ред. З.А. Суслиной. – Москва: Атмосфера, 2005. – С.206-215.
83. Суслина, З.А. Сосудистые заболевания головного мозга. Эпидемиология. Патогенетические механизмы. Профилактика / З.А. Суслина, Ю.Я. Варакин, Н.В. Верещагин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: МЕДпресс-информ, 2009. – 350с.

84. Суслина, З.А. Инсульт: оценка проблемы (15 лет спустя) / З.А. Суслина, М.А. Пирадов, М.А. Домашенко // Журн. неврологии и психиатрии. – 2014. – Т. 114, №11. – С. 5-13.
85. Тучин, В.В. Введение в оптику биотканей: конспекты лекций / В.В. Тучин. – Москва: Изд-во МГУ, 1995. – 56с.
86. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных: справочник. – Санкт-Петербург: ЛЕМА, 2013. – 116 с.
87. Фурсова, Л.А. Лазерная терапия при цереброваскулярных заболеваниях / Л.А. Фурсова, Л.Е. Козловская // ARS MEDICA. – 2009. – №3 (13). – С. 132-139.
88. Чикишев, А.Ю. Основные свойства и характеристики лазерного излучения / А.Ю. Чикишев. – Москва: МГУ, 1995. – 152 с.
89. Шмонин, А.А. Эндогенная нейропротекция при ишемии мозга: эритропоэтин, пре-и посткондиционирование / А.А. Шмонин, И.Ю. Панов, А.В. Симаненкова [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2010. – Т. 4, №3. – С. 29-35.
90. Шмонин, А.А. Защитные эффекты раннего ишемического preconditionирования при фокальной ишемии мозга у крыс: роль коллатерального кровообращения / А.А. Шмонин, А.Е. Байса, Е.В. Мельникова [и др.] // Рос. физиологический журн. им. Сеченова. – 2011. – Т.97, №2. – С. 203-213.
91. Шмонин, А.А. Экспериментальное исследование нейропротективных свойств альфа-липоевой кислоты и супероксиддисмутазы при ишемии мозга у крыс / А.А. Шмонин, Е.В. Мельникова, И.В. Чурилова [и др.] // Рос. физиологический журн. им. Сеченова. – 2011. – Т. 97, №1. – С. 65-71.
92. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптационных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.И. Долгушин, О.Л. Колесников [и др.]. – Челябинск: Изд-во ЧГПУ, 2000. – 167 с.
93. Abeysinghe, H.C.S. Modulating Astrocyte Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase / H.C.S.

- Abeyasinghe, E.L. Phillips, H. Chin-Cheng [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2016. – Vol.17, №3. – P. 288.
94. Agnello, D. Erythropoietin exerts an anti - inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. / D. Agnello, P. Bigini, P. Villa [et al.] // Brain Res. – 2002. – Vol.952, №1. – P. 128-134.
95. Alayat, M.S. Efficacy of high-intensity laser therapy in the treatment of chronic neck pain: a randomized double-blind placebo-control trial / M.S. Alayat, A.A. Mohamed, O.F. Helal [et al.] // Lasers Med Sci. – 2016. – Vol.31, №4. – P. 687-694.
96. Anagnostou, A. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells / A. Anagnostou, Z. Liu, M. Steiner [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1994. – Vol.91. – P. 3974-3978.
97. Ansari, M.A. Study of short-pulse laser propagation in biological tissue by means of the boundary element method / M.A. Ansari, R. Massudi // Lasers Med Sci. – 2011. – Vol.26, №4. – P. 503-508.
98. Ansari, M.A. Mechanisms of Laser-Tissue Interaction: II. Tissue Thermal Properties / M.A. Ansari, M. Erfanzadeh, E. Mohajerani // J Lasers Med Sci. – 2013. – Vol.4, №3. – P. 99-106.
99. Arbo, B.D. Astrocytes as a target for neuroprotection: Modulation by progesterone and dehydroepiandrosterone / B.D.Arbo, F.Bennetti, M.F. Ribeiro // Prog Neurobiol. – 2016. – Vol.144. – P. 27-47.
100. Arcasoy, M.O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin / M.O. Arcasoy // Br J Haematol. – 2008. – Vol.141, №1. – P. 14-31.
101. Azab, S.F. Iron deficiency anemia as a risk factor for cerebrovascular events in early childhood: a case-control study / S.F. Azab, S.M. Abdelsalam, S.H. Saleh [et al.] // Ann Hematol. – 2014. – Vol.93, №4. – P. 571-576.
102. Bai, Y. Pericytes contribute to the disruption of the cerebral endothelial barrier via increasing VEGF expression: implications for stroke / Y. Bai, X. Zhu, J. Chao [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol.10, №4. – P. e0124362.

103. Bailey, D.M. Erythropoien depletes iron strokes: an oxidant neuroprotection for ischemic stroke? / D.M. Bailey, P. Robach, J.J. Thomsen [et al.] // *Stroke*. – 2006. – Vol.37. – P. 2453.
104. Bauer, C. Erythropoietin – from gene structure to therapeutic applications / C. Bauer // *J. Perinat. Med.* – 1995. – Vol. 23, №1-2. – P.77-81.
105. Becker, K.J. Intraarterial thrombolysis in vertebrobasilar occlusion / K.J. Becker, L.H. Monsein, J. Ulatowski [et al.] // *AJNR Am J Neuroradiol.* – 1996. – Vol.17, №2. – P. 255-262.
106. Becker, K.J. Anti-leukocyte antibodies: LeukArrest (Hu23F2G) and Enlimomab (R6.5) in acute stroke / K.J. Becker // *Curr Med Res Opin.* – 2002. – Vol.18. – P. s18-s22.
107. Beckman, B.S. The action of erythropoietin is mediated by lipoxxygenase metabolits in murine fetal liver cells / B.S. Beckman, M. Mason, L. Nystuen [et al.] // *BBRC.* – 1987. – Vol.147. – P. 392-397.
108. Bennett, M.R. Neuronal cell death in the mammalian nervous system: the calmortin hypothesis / M.R. Bennett, K.R. Huxlin // *Gen Pharmacol.* – 1996. – Vol.27, №3. – P. 407-419.
109. Beretta, S. Cerebral collateral flow defines topography and evolution of molecular penumbra in experimental ischemic stroke / S. Beretta, E. Cuccione, A. Versace [et al.] // *Neurobiol Dis.* – 2015. – Vol.74. – P.305-313.
110. Bernaudin, M. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen– sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain / M. Bernaudin, A. Bellail, H.H. Marti [et al.] // *Glia.* – 2000. – Vol. 30, №3. – P.271-278.
111. Beru, N. Expression of the erythropoietin gene / N. Beru, J. McDonald, C. Lacombe [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 1986. – Vol.6. – P. 2571-2575.
112. Biggar, P. Treatment of renal anemia: Erythropoiesis stimulating agents and beyond / P. Biggar, G.H. Kim // *Kidney Res Clin Pract.* – 2017. – Vol.36, №3. – P. 209-223.

113. Blixt, J. Erythropoietin Attenuates the Brain Edema Response after Experimental Traumatic Brain Injury / J.Blixt, E.Gunnarson, M. Wanecek // JNeurotrauma. – 2018. – Vol.35, №4. – P. 671-680.
114. Bogaert, L. Neurochemical changes and laser Doppler flowmetry in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischemia / L. Bogaert, D. Scheller, J. Moonen [et al.] // Brain Res. – 2000. – Vol.887, №2. – P. 266-275.
115. Boyraz, I. Comparison of high-intensity laser therapy and ultrasound treatment in the patients with lumbar discopathy / I. Boyraz, A. Yildiz, B. Koc [et al.] // Biomed Res Int. – 2015. – Vol.2015. – P. 304328.
116. Bramlett, H.M. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences / H.M. Bramlett, W.D. Dietrich // J Cereb Blood Flow Metab. – 2004. – Vol.24, №2. – P. 133-150.
117. Brines, M.L. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury / M.L. Brines, P. Ghezzi, S. Keenan [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2000. – Vol.97. – P. 10526-10531.
118. Brouns, R. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke / R. Brouns, P.P. De Deyn // Clin Neurol Neurosurg. – 2009. – Vol.111, №6. – P. 483-495.
119. Buemi, M. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection / M. Buemi, E. Cavallaro, F. Floccari [et al.] // Clin Science. – 2002. – Vol. 103, №3. – P. 275-282.
120. Byts, N. Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin / N. Byts, A. Samoylenko, T. Fasshauer [et al.] // Cell Death Differ. – 2008. – Vol.15. – P. 783-792.
121. Cao, F. Delayed neuronal cell death in brainstem after transient brainstem ischemia in gerbils / F. Cao, R. Hata, P. Zhu [et al.] // BMC Neurosci. – 2010. – Vol.11. – P. 115.
122. Carone, D. Pravastatin acute neuroprotective effects depend on blood brain barrier integrity in experimental cerebral ischemia / D. Carone, L. Librizzi, A. Cattalini [et al.] // Brain Res. – 2015. – Vol.1615. – P. 31-41.

123. CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20,000 patients with acute ischaemic stroke // *Lancet*. – 1997. – Vol. 349, №9066. – P. 1641-1649.
124. Celik, M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury / M. Celik, N. Gokmen, S. Erbayraktar [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. – Vol.99. – P. 2258-2263.
125. Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription / N.S. Chandel, E. Maltepe, E. Goldwasser [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – Vol.95. – P.11715-11720.
126. Chang, Y.L. Association between ischemic stroke and iron-deficiency anemia: a population-based study / Y.L. Chang, S.H. Hung, W. Ling [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol.8. – P. 82952.
127. Chen, S.T. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction / S.T.Chen, C.Y.Hsu, E.L.Hogan [et al.] // *Stroke*. – 1986. – Vol.17, №4. – P. 738-743.
128. Chikuma, M. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain and uterus / M. Chikuma, S. Masuda, T. Kobayashi [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol.279. – P. 1242-1248.
129. Chung, H. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy / H. Chung, T. Dai, S.K. Sharma [et al.] // *Ann Biomed Eng.* – 2012. – Vol. 40, №2. – P. 516-533.
130. Citow, J.S. Comprehensive Neurosurgery Board Review / J.S. Citow, R. Loch Macdonald, D. Refai. – New York; Stuttgart: Thieme, 2009. – 576 p.
131. D'Andrea, A.D. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation / A.D. D'Andrea, L.I. Zon // *J. Clin. Invest.* – 1990. – Vol. 86, №3. – P. 681-687.
132. DeDeyn, P.P. Treatment of acute ischemic Stroke with piracetam. Members of the Piracetamin Acute Stroke Study (PASS) Group / P.P. DeDeyn, J.D. Reuck, W. Deberdt [et al.] // *Stroke*. – 1997. – Vol. 28. – P. 2347-2352.
133. Del Zoppo G.J. Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke / G.J. Del Zoppo, R. von Kummer, G.F. Hamann // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 1998. – Vol.65, №1. – P.1-9.

134. Del Zoppo, G.J. Expansion of the Time Window for Treatment of Acute Ischemic Stroke With Intravenous Tissue Plasminogen Activator: A Science Advisory From the American Heart Association/American Stroke Association/ G.J. Del Zoppo, J.L. Saver, E.C. Jauch [et al.] // *Stroke*. – 2009. – Vol.40. – P. 2945-2948.
135. Del Zoppo, G.J. The neurovascular unit in the setting of stroke / G.J. Del Zoppo // *J. Intern. Med.* – 2010. – Vol.267, №2. – P. 156-171.
136. Doggrell, S.A. A neuroprotective derivative of erythropoietin that is not erythropoietic / S.A. Doggrell // *Expert. Opin. Investing. Drugs*. – 2004. – Vol. 13, №11. – P. 1517-1519.
137. Donnan, G.A. Stroke / G.A. Donnan, M. Fisher, M. Macleod [et al.] // *Lancet*. – 2008. – Vol. 71, №9624. – P. 1612-1623.
138. Dunder, U. Effectiveness of high-intensity laser therapy and splinting in lateral epicondylitis; a prospective, randomized, controlled study / U. Dunder, U. Turkmen, H. Toktas [et al.] // *Lasers Med Sci*. – 2015. – Vol.30, №3. – P. 1097-1107.
139. Dzierko, M. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke / M.Dzierko, N.Derugin, M.F. Wendland [et al.] // *Transl Stroke Res*. – 2013. – Vol.4, №2. – P. 189-200.
140. Ebid, A.A. Long-term effect of pulsed high-intensity laser therapy in the treatment of post-mastectomy pain syndrome: a double blind, placebo-control, randomized study / A.A. Ebid, A.M. El-Sodany // *Lasers Med Sci*. – 2015. – Vol.30, №6. – P. 1747-1755.
141. Eckert, B. Endovascular therapy of acute vertebrobasilar occlusion: early treatment onset as the most important factor / B. Eckert, T. Kucinski, G. Pfeiffer [et al.] // *Cerebrovasc Dis*. – 2002. – Vol.14, №1. – P. 42-50.
142. Erman, A. Effects of bivalent cations on prostaglandin biosynthesis and phospholipase A2 activation in rabbit kidney medulla slices / A. Erman, R. Amiran // *Biochem. J*. – 1979. – Vol.182. – P. 821-825.
143. Erythropoietin and the Nervous System / ed. A. Höke. – Berlin: Springer, 2006. – 224 p.

144. Fantacci, M. Carbamylated erythropoietin ameliorates the metabolic stress induced in vivo by severe chronic hypoxia / M. Fantacci, P. Bianciardi, A. Caretti// *ProcNatlAcadSciUSA*. – 2006. – Vol.103, №46. – P. 17531-17536.
145. Faure, S. Synergistic protective effects of erythropoietin and olmesartan on ischemic stroke survival and post– stroke memory dysfunctions in the gerbil / S. Faure, N. Oudart, J. Javellaud // *J Hypertens*. – 2006. – Vol.24, №11. – P.2255-2261.
146. Fenjves, E.S. Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors / E.S. Fenjves, M.S. Ochoa, O. Cabrera [et al.] // *Transplantation*. – 2003. – Vol. 75. – P. 1356-1360.
147. Fisher, M. Prophylactic neuroprotection for cerebral ischemia / M. Fisher, S. Jonas, R.L. Sacco [et al.] // *Stroke*. – 1994. – Vol.25, №5. – P. 1075-1080.
148. Forder, J.P. Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules / J.P. Forder, M. Tymianski // *Neuroscience*. – 2009. – Vol.158, №1. – P. 293-300.
149. Furlan, A.J. Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): Evidence of Safety and Efficacy 3 to 9 Hours After Stroke Onset / A.J. Furlan, D. Eyding, G.W. Albers [et al.] // *Stroke*. – 2006. – Vol.37. – P. 1227-1231.
150. Garcia, J.H. Early reperfusion as a rationale form of therapy in ischemic stroke / J.H. Garcia // *Rev. Neurol*. – 1995. – Vol. 23, №123. – P. 1067-1073.
151. Gardner, D.G. Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology / D.G. Gardner, D. Shoback. – 9th ed. – [S.l.]:McGraw-Hill, 2011. – 912 p.
152. Ginsberg, M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future / M.D. Ginsberg // *Neuropharmacology*. – 2008. – Vol.55, №3. – P. 363-389.
153. Guo, H. Vascular endothelial growth factor: an attractive target in the treatment of hypoxic/ischemic brain injury / H. Guo, H. Zhou, J. Lu [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2016. – Vol. 11, №1. – P. 174-179.
154. Guzik, A. Stroke Epidemiology and Risk Factor Management / A. Guzik, C. Bushnell // *Continuum (Minneap Minn)*. – 2017. – Vol.23,№1, Cerebrovascular Disease. – P. 15-39.

155. Hacke, W. Intravenous Thrombolysis With Recombinant Tissue Plasminogen Activator for Acute Hemispheric Stroke The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) / W. Hacke, M. Kaste, C. Fieschi [et al.] // JAMA. – 1995. – Vol.274, №13. – P. 1017-1025.
156. Hacke, W. Randomised double– blind placebo– controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischemic stroke (ECASS II) / W. Hacke, M. Kaste, C. Fieschi [et al.] // Lancet. – 1998. – Vol.352. – P. 1245-1251.
157. Hacke, W. The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS). A Phase II MRI – Based 9– Hour Window Acute Stroke Thrombolysis Trial With Intravenous Desmoteplase / W. Hacke, G. Albers, Y. Al-Rawi [et al.] // Stroke. – 2005. – Vol.36. – P. 66-73.
158. Hacke, W. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke / W. Hacke, M. Kaste, E. Bluhmki [et al.] // N Engl J Med. – 2008. – Vol.359, №13. – P. 1317-1329.
159. Hamblin, M.R. Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke / M.R. Hamblin // J Neurosci Res. – 2018. – Vol.96, №4. – P. 731-743.
160. Hao, Z. A cohort study of patients with anemia on admission and fatality after acute ischemic stroke / Z. Hao, B. Wu, D. Wang [et al.] // J Clin Neurosci. –2013. – Vol.20. – P. 37-42.
161. Hata, R. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice/ R.Hata, K.Maeda, D.Hermann [et al.] // J Cerebr Blood Flow Metab. – 2000. – Vol.20, №6. – P. 937-946.
162. Hegstad, E. Amino-acid release from human cerebral cortex during simulated ischaemia in vitro / E. Hegstad, J. Berg-Johnsen, T.S. Haugstad [et al.] // Acta Neurochir (Wien). – 1996. – Vol.138, №2. – P. 234-241.
163. Heiss, W.D. Cerebrolysin in patients with acute ischemic stroke in Asia: results of a double-blind, placebo-controlled randomized trial / W.D. Heiss, M. Brainin, N.M. Bornstein [et al.] // Stroke. – 2012. – Vol. 43. – P. 630-636.
164. Heiss, W.D. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? / W.D.Heiss // Ann N Y Acad Sci. – 2012. – Vol.1268. – P. 26-34.

165. Heit, J.J. Perfusion Computed Tomography for the Evaluation of Acute Ischemic Stroke: Strengths and Pitfalls / J.J.Heit, M. Wintermark // *Stroke*. – 2016. – Vol.47, №4. – P. 1153-1158.
166. Henderson, T.A. Near-infrared photonic energy penetration – can infrared phototherapy effectively reach the human brain? / T.A. Henderson, L.D. Morries// *Neuropsychiatr Dis Treat*. – 2015. – Vol.11. – P. 2191-2208.
167. Hermann, D.M. Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling / D.M. Hermann, A. Zechariah // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. – 2009. – Vol.29. – P. 1620-1643.
168. Hong, Z. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial to evaluate the safety and efficacy of Cerebrolysin in patients with acute ischemic stroke in Asia-CASTA / Z. Hong, H. Moessler, N. Bornstein [et al.] // *Int J Stroke*. – 2009. – Vol.4, №5. – P. 406-412.
169. Hossmann, K.A. Periinfarct depolarizations / K.A. Hossmann // *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev*. – 1996. – Vol.8. – P. 195-208.
170. Hossmann, KA. Experimental models for the investigation of brain ischemia / KA. Hossmann // *Cardiovasc Res*. – 1998. – Vol.39. – P.106-120.
171. Hossmann, K.A. The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research / K.A. Hossmann // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2012. – Vol.32, №7. – P. 1310-1316.
172. Huang, Y. Ischemic Stroke. “Acidotoxicity” Is a Perpetrator / Y. Huang, J.O. McNamara // *Cell*. – 2004. – Vol. 118, №6. – P. 665-666.
173. Huang, Y.Y. Biphasic dose response in low level light therapy / Y.Y. Huang, A.C. Chen, J.D. Carroll [et al.] // *Dose Response*. – 2009. – Vol. 7, №4. – P. 358-383.
174. Huisa, B.N. Incremental treatments with laser therapy augments good behavioral outcome in the rabbit small clot embolic stroke model / B.N. Huisa, Y. Chen, B.C. Meyer [et al.] // *Lasers Med Sci*. – 2013. – Vol.28, №4. – P. 1085-1089.
175. Jauch, E.C. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart

Association/American Stroke Association / E.C. Jauch, J.L. Saver, H.P. Jr Adams [et al.] // *Stroke*. – 2013. – Vol.44, №3. – P. 870-947.

176. Jean LeBlanc, N. Vascular Endothelial Growth Factor Isoform-B Stimulates Neurovascular Repair After Ischemic Stroke by Promoting the Function of Pericytes via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 / N. Jean LeBlanc, R. Guruswamy, A. ElAli [et al.] // *Mol Neurobiol*. – 2018. – Vol.55, №5. – P. 3611-3626.

177. Jenkins, L.W. The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia / L.W. Jenkins, J.T. Povlishock, W. Lewelt [et al.] // *Acta Neuropathol (Berl)*. – 1981. – Vol.55. – P. 205-220.

178. Jin, R. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells / R. Jin, G. Yang, G. Li. // *J Leukoc Biol*. – 2010. – Vol.87, №5. – P. 779-789.

179. Jittiwat, J. Laser Acupuncture at GV20 Improves Brain Damage and Oxidative Stress in Animal Model of Focal Ischemic Stroke / J. Jittiwat // *J Acupunct Meridian Stud*. – 2017. – Vol.10, №5. – P. 324-330.

180. Kaiafa, G. Anemia and stroke: Where do we stand? / G. Kaiafa, C. Savopoulos, I. Kanellos [et al.] // *Acta Neurol Scand*. – 2017. – Vol.135, №6. – P. 596-602.

181. Karu, T.I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide / T.I. Karu, L.V. Pyatibrat, N.I. Afanasyeva // *Lasers Surg Med*. – 2005. – Vol.36, №4. – P. 307-314.

182. Karu, T. Is it time to consider photobiomodulation as a drug equivalent? / T. Karu // *Photomed Laser Surg*. – 2013. – Vol.31, №5. – P. 189-191.

183. Ke, Q. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) / Q. Ke, M. Costa // *Mol Pharmacol*. – 2006. – Vol.70, №5. – P. 1469-1480.

184. Khan, M. Promoting endothelial function by S-nitrosoglutathione through the HIF-1 α /VEGF pathway stimulates neurorepair and functional recovery following experimental stroke in rats / M. Khan, T.S. Dhammu, F. Matsuda [et al.] // *Drug Des Devel Ther*. – 2015. – Vol.9. – P. 2233-2247.

185. Kiessling, M. Focal cerebral ischemia: molecular mechanisms and new therapeutic strategies / M.Kiessling, K.A. Hossmann // *Brain Pathol.* – 1994. – Vol.4, №1. – P. 21-22.
186. Komnig, D. Faim2 contributes to neuroprotection by erythropoietin in transient brain ischemia / D. Komnig, K. Gertz, P. Habib // *J Neurochem.* – 2018. – Vol.145, №3. – P. 258-270.
187. Kumral, A. Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury / A. Kumral, S. Genc, E. Ozer [et al.] // *Biol Neonate.* – 2006. – Vol.89, №3. – P. 205-210.
188. Ladurner, G. Neuroprotective treatment with cerebrolysin in patients with acute stroke: a randomized controlled trial / G. Ladurner, P. Kalvach, H. Moessler [et al.] // *J Neural Transm.* – 2005. – Vol.112. – P. 415-428.
189. Lampl, Y. Infrared laser therapy for ischemic stroke: a new treatment strategy: results of the NeuroThera Effectiveness and Safety Trial-1 (NEST-1) / Y. Lampl, J.A. Zivin, M. Fisher [et al.] // *Stroke.* – 2007. – Vol. 38, №6. – P. 1843-1849.
190. Lands, W.E.M. Oxygen requirement for prostaglandin biosynthesis / W.E.M. Lands, J. Sauter, G.W. Stone // *Prostaglandins Med.* – 1978. – №2. – P. 117-120.
191. Lapchak, P.A. Taking a light approach to treating acute ischemic stroke patients: transcranial near-infrared laser therapy translational science / P.A. Lapchak // *Ann Med.* – 2010. – Vol.42, №8. – P. 576-586.
192. Lapchak, P.A. Fast neuroprotection (fast-NPRX) for acute ischemic stroke victims: the time for treatment is now / P.A. Lapchak // *Transl Stroke Res.* – 2013. – Vol.4, №6. – P. 704-709.
193. Lapchak, P.A. Transcranial Near-Infrared Laser Transmission (NILT) Profiles (800 nm): Systematic Comparison in Four Common Research Species / P.A.Lapchak, P.D.Boitano, P.V. Butte [etal.] // *PLoSOne.* – 2015. – Vol.10, №6. – P. e0127580.
194. Lapchak, P.A. Transcranial Near-Infrared Laser Therapy for Stroke: How to Recover from Futility in the NEST-3 Clinical Trial / P.A. Lapchak, P.D.Boitano // *Acta Neurochir Suppl.* – 2016. – Vol.121. – P. 7-12.

195. Lee, M. Efficacy of Intra- Arterial Fibrinolysis for Acute Ischemic Stroke Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials / M. Lee, K.-S. Hong, J.L. Saver // *Stroke*. – 2010. – Vol.41. – P. 932-937.
196. Lees, K.R. NXY-059 for acute ischemic stroke / K.R. Lees, J.A. Zivin, T. Ashwood [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol.354. – P. 588-600.
197. Lewandowski, C.A. Combined Intravenous and Intra-Arterial r-TPA Versus Intra-Arterial Therapy of Acute Ischemic Stroke. Emergency Management of Stroke (EMS) Bridging Trial / C.A. Lewandowski, M. Frankel, T.A. Tomsick [et al.] // *Stroke*. – 1999. – Vol.30, №12. – P. 2598-2605.
198. Li, C. Post-stroke Constraint-induced Movement Therapy Increases Functional Recovery, Angiogenesis, and Neurogenesis with Enhanced Expression of HIF-1 α and VEGF / C. Li, B. Zhang, Y. Zhu [et al.] // *Curr Neurovasc Res.* – 2017. – Vol.14, №4. – P. 368-377.
199. Liebeskind, D.S. Computed Tomography Perfusion in Acute Ischemic Stroke: Is It Ready for Prime Time? / D.S.Liebeskind, M.W.Parsons, M.Wintermark [et al.] // *Stroke*. – 2015. – Vol.46, №8. – P. 2364-2367.
200. Lindsberg, P.J. Therapy of basilar artery occlusion: a systematic analysis comparing intra-arterial and intravenous thrombolysis / P.J.Lindsberg, H.P. Mattle // *Stroke*. – 2006. – Vol.37, №3. – P. 922-928.
201. Lisboa, R.C. Analysis of the Safety and Efficacy of Intra- Arterial Thrombolytic Therapy in Ischemic Stroke / R.C. Lisboa, B.D. Jovanovic, M.J. Alberts // *Stroke*. – 2002. – Vol.33. – P. 2866-2871.
202. Liu, Z. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke / Z. Liu, M. Chopp // *Prog Neurobiol.* – 2016. – Vol.144. – P. 103-120.
203. Locatelli, F. Current and future chemical therapies for treating anaemia in chronic kidney disease / F. Locatelli, L. DelVecchio, M.C. Luise // *Expert Opin Pharmacother.* – 2017. – Vol.18, №8. – P. 781-788.

204. Lombardero, M. Erythropoietin: A hormone with multiple functions / M. Lombardero, K. Kovacs, B.W. Scheithauer // *Pathobiology*. – 2011. – Vol. 78. – P. 41-53.
205. MacDermott, A.B. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons / A.B. MacDermott, M.L. Mayer, G.L. Westbrook [et al.] // *Nature*. – 1986. – Vol.321, №6069. – P. 519-522.
206. Maguire, J.L. Association between iron-deficiency anemia and stroke in young children / J.L. Maguire, G. deVeber, P.C. Parkin // *Pediatrics*. – 2007. – Vol.120. – P. 1053-1057.
207. Mallet, R.T. Erythropoietin: Endogenous Protection of Ischemic Brain / R.T. Mallet, M.G. Ryou // *Vitam Horm*. – 2017. – Vol.105. – P. 197-232.
208. Mărgăritescu, O. VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke / O.Mărgăritescu, D.Pirici, C.Mărgăritescu // *Rom. J. Morphol. Embryol*. – 2011. – Vol.52, №4. – P. 1283-1292.
209. Martelo, O.J. Activation of renal erythropoietic factor by phosphorylation / O.J. Martelo, E.F. Toro, J. Hirsch // *J Lab Clin Med*. – 1976. – Vol.87, №1. – P. 83-88.
210. Martins-Ferreira, H. Perspectives on spreading depression / H.Martins-Ferreira, M.Nedergaard, C. Nicholson // *Brain Res Brain Res Rev*. – 2000. – Vol.32, №1. – P. 215-234.
211. Masuda, S. Insulinlike growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes / S. Masuda, M. Chikuma, R. Susaki // *Brain Res*. – 1997. – Vol.745. – P. 63-70.
212. McPherson, R.J. Erythropoietin for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy / R.J. McPherson, S.E. Juul // *Curr. Opin. Pediatr*. – 2010. – Vol. 22, №2. – P. 139-145.
213. Menon, B.K. Trends in endovascular therapy and clinical outcomes within the nationwide Get With The Guidelines-Stroke registry / B.K. Menon, J.L. Saver, M. Goyal [et al.] // *Stroke*. – 2015. – Vol.46, №4. – P. 989-995.

214. Menyhárt, Á. Spreading depolarization remarkably exacerbates ischemia-induced tissue acidosis in the young and aged rat brain / Á.Menyhárt, D. Zölei-Szénási, T. Puskás [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol.7, №1. – P. 1154.
215. Mi, X.Q. Effect of low power laser irradiation on disconnecting the membrane-attached hemoglobin from erythrocyte membrane / X.Q. Mi, J.Y. Chen, L.W. Zhou // *J Photochem Photobiol B.* – 2006. – Vol.83, №2. – P. 146-150.
216. Milano, M. Erythropoietin and neuroprotection: a therapeutic perspective / M. Milano, R. Collomp // *J. Oncol. Pharm. Pract.* – 2005. – Vol. 11, № 4. – P. 145-149.
217. Miljus, N. Neuroprotection and endocytosis: erythropoietin receptors in insect nervous systems / N. Miljus, B. Massih, M.A. Weis [et al.] // *J Neurochem.* – 2017. – Vol.141, №1. – P. 63-74.
218. Miller, B. Erythropoietin stimulates a rise in intracellular free calcium concentration in single BFU– E derived erythroblasts at specific staged of differentiation / B. Miller, J. Cheung, D. Tillotson [et al.] // *Blood.* – 1989. – Vol.73. – P. 1188-1194.
219. Moransard, M. Erythropoietin reduces experimental autoimmune encephalomyelitis severity via neuroprotective mechanisms / M. Moransard, M. Bednar, K. Frei [et al.] // *J Neuroinflammation.* – 2017. – Vol.14, №1. – P. 202.
220. Moreira, M.S. Effect of laser phototherapy on wound healing following cerebral ischemia by cryogenic injury / M.S. Moreira, I.T. Velasco, L.S. Ferreira [et al.] // *J Photochem Photobiol B.* – 2011. – Vol.105, №3. – P. 207-215.
221. Morishita, E. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate– induced neuronal death / E. Morishita, S. Masuda, M. Nagao [et al.] // *Neuroscience.* – 1997. – Vol.76. – P. 105-116.
222. Morries, L.D. Treatments for traumatic brain injury with emphasis on transcranial near-infrared laser phototherapy / L.D. Morries, P. Cassano, T.A. Henderson // *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* – 2015. – Vol.11. – P. 2159-2175.

223. Muir, K.W. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomized controlled trial / K.W. Muir, I. Ford, J.L. Reid [et al.] // *Lancet*. – 2004. – Vol.363. – P. 439-445.
224. Muller, A.J. Hypoxic ischemic brain injury: Potential therapeutic interventions for the future / A.J. Muller, J.D. Marks // *Neoreviews*. – 2014. – Vol.15, №5. – P. e177-e186.
225. Nagai, A. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture / A. Nagai, E. Nakagawa, H.B. Choi [et al.] // *J Neuropathol Exp Neurol*. – 2001. – Vol.60. – P. 386-392.
226. Nishimura, K. Effect of erythropoietin production induced by hypoxia on autophagy in HepG2 cells / K. Nishimura, K. Goto, H. Nakagawa // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2018. – Vol.495, №1. – P. 1317-1321.
227. Noguchi, K.K. Isoflurane exposure for three hours triggers apoptotic cell death in neonatal macaque brain / K.K. Noguchi, S.A. Johnson, G.A. Dissen [et al.] // *Br J Anaesth*. – 2017. – Vol.119, №3. – P. 524-531.
228. Nogueira, R.G. Safety and Efficacy of a 3-Dimensional Stent Retriever With Aspiration-Based Thrombectomy vs Aspiration-Based Thrombectomy Alone in Acute Ischemic Stroke Intervention: A Randomized Clinical Trial / R.G. Nogueira, D. Frei, J.F. Kirmani [et al.] // *JAMA Neurol*. – 2018. – Vol.75, №3. – P. 304-311.
229. Ntaios, G. The neuroprotective role of erythropoietin in the management of acute ischaemic stroke: from bench to bedside / G. Ntaios, C. Savopoulos, A. Chatzinikolaou [et al.] // *Acta Neurol Scand*. – 2008. – Vol.118. – P. 362-366.
230. O'Collins, V.E. 1,026 experimental treatments in acute stroke / V.E. O'Collins, M.R. Macleod, G.A. Donnan [et al.] // *Ann Neurol*. – 2006. – Vol.59. – P. 467-477.
231. Olney, J.W. Focus on apoptosis to decipher how alcohol and many other drugs disrupt brain development / J.W. Olney // *Front Pediatr*. – 2014. – Vol.2. – P. 81.
232. Oron, A. Low level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits / A. Oron, U. Oron, J. Chen [et al.] // *Stroke*. – 2006. – Vol.37. – P. 2620-2624.

233. Ostrowski, D. Alternative Erythropoietin Receptors in the Nervous System / D.Ostrowski, R. Heinrich // J Clin Med. – 2018. – Vol.7, №2. – P.E24.
234. Panjeta, M. Interpretation of Erythropoietin and Haemoglobin Levels in Patients with Various Stages of Chronic Kidney Disease / M.Panjeta, I.Tahirović, E. Sofić [et al.] // J. Med. Biochem. – 2017. – Vol.36, №2. – P. 145-152.
235. Passarella, S. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation / S. Passarella, T. Karu // J Photochem Photobiol B. – 2014. – Vol.140. – P. 344-358.
236. Patel, R.A.G. Neuroprotection in the Treatment of Acute Ischemic Stroke / R.A.G. Patel, P.W. McMullen // Prog Cardiovasc Dis. – 2017. – Vol.59, №6. – P. 542-548.
237. Patel, R.A.G. Stroke Treatment and Prevention / R.A.G. Patel, C.J. White // Prog Cardiovasc Dis. – 2017. – Vol.59, №6. – P. 525-526.
238. Paul, C.L. How can we improve stroke thrombolysis rates? A review of health system factors and approaches associated with thrombolysis administration rates in acute stroke care / C.L. Paul, A. Ryan, S. Rose [et al.] // Implementation Science: IS. – 2015. – Vol.11. – P. 51-63.
239. Pfefferkorn, T. Drip, ship, and retrieve: cooperative recanalization therapy in acute basilar artery occlusion / T. Pfefferkorn, M.Holtmannspötter, C.Schmidt[et al.] // Stroke. – 2011. – Vol.41, №4. – P. 722-726.
240. Ramos, A. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial / A. Ramos // Behav. BrainRes. – 2008. – Vol. 193, №2. – P. 277-288.
241. Ren, J.M. Cerebrolysin enhances functional recovery following focal cerebral infarction in rats / J.M. Ren, D. Sietsma, S. Qiu [et al.] // Restor Neurol Neurosci. – 2007. – Vol.25. – P. 25-31.
242. Rewell, S.S. Evolution of ischemic damage and behavioural deficit over 6 months after MCAo in the rat: Selecting the optimal outcomes and statistical power for

- multi-centre preclinical trials / S.S.Rewell, L.Churilov, T.K. Sidon [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol.12, №2. – P. e0171688.
243. Ribatti, D. Human erythropoietin induces a pro- angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo / D. Ribatti, M. Presta, A. Vacca [et al.] // Blood. – 1999. – Vol.93. – P. 2627-2636.
244. Rochkind, S. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration / S. Rochkind, S. Geuna, A. Shainberg // Int Rev Neurobiol. – 2009. – Vol.87. – P. 445-464.
245. Rochkind, S. Increase of neuronal sprouting and migration using 780 nm laser phototherapy as procedure for cell therapy / S. Rochkind, D. El-Ani, Z.Nevo [et al.] // Lasers Surg Med. – 2009. – Vol.41, №4. – P. 277-281.
246. Sacco, R.L. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / R.L.Sacco, S.E.Kasner, J.P. Broderick [et al.] // Stroke. – 2013. – Vol.44, №7. – P. 2064-2089.
247. Sakanaka, M. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage / M. Sakanaka, T.C. Wen, S. Matsuda [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, №8. – P. 4635-4640.
248. Sandercock, P. Update on the third international stroke trial (IST-3) of thrombolysis for acute ischaemic stroke and baseline features of the 3035 patients recruited / P. Sandercock, R. Lindley, J. Wardlaw [et al.] // Trials. – 2011. – Vol.12. – P. 252.
249. Saver, J.L. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair / J.L. Saver // Reviews in neurological diseases. – 2008. – Vol.5. – P. 167-177.
250. Saver, J.L. Endovascular recanalization in acute ischemic stroke: regionalized organization of care / J.L. Saver // Neurology. – 2012. – Vol.79, №13, suppl. 1. – P. S3-4.
251. Saver, J.L. Prehospital use of magnesium sulfate as neuroprotection in acute stroke / J.L. Saver, S. Starkman, M. Eckstein [et al.] // N Engl J Med. – 2015. –

Vol.372. – P. 528-536.

252. Sawyer, S.T. Erythropoietin stimulates Ca uptake in Friend Virus– infected erythroid cells / S.T. Sawyer, S.B. Krantz // J. Biol. Chem. – 1984. – Vol.259. – P. 1769-1774.

253. Schellinger, P.D. Near-infrared laser treatment of acute stroke: from bench to bedside / P.D. Schellinger, M. Köhrmann // Nervenarzt. – 2012. – Vol.83, №8. – P. 966-974.

254. Shimotake, J. Vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition promotes cell death and limits endothelial cell proliferation in a neonatal rodent model of stroke / J. Shimotake, N. Derugin, M. Wendland [et al.] // Stroke. – 2010. – Vol.41. – P. 343-349.

255. Shingo, T. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells / T. Shingo, S.T. Sorokan, T. Shimazaki [et al.] // J. Neurosci. – 2001. – Vol.21. – P. 9733- 9743.

256. Siesio, B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia: part 1: pathophysiology / B.K. Siesio // J. Neurosurg. – 1992. – Vol. 77, №2. – P. 169-184.

257. Silver, I.A. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells / I.A. Silver, J. Deas, M. Erecińska // Neuroscience. – 1997. – Vol.78, №2. – P. 589-601.

258. Siren, A.L. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress / A.L. Siren, M. Fratelli, M. Brines [et al.] // ProcNatl Acad Sci USA. – 2001. – Vol.98, №7. – P. 4044-4049.

259. Siren, A.L. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin / A.L. Siren, K. Radyushkin, S. Boretius [et al.] // Brain. – 2006. – Vol. 129, № 2. – P. 480-489.

260. Skvortsova, V.I. Results of implementation of intravenous thrombolysis in stroke patients in the Russian Federation in 2009-2010: Data of hospital registry / V.I. Skvortsova, L.V. Stakhovskaya, N.A. Shamalov [et al.] // CerebrovascDis. – 2011. – Vol. 31, suppl. 2. – P. 48.

261. Small, D.L. Biology of ischemic cerebral cell death/ D.L. Small, P. Morley, A.M. Buchan // *Prog Cardiovasc Dis.* – 1999. – Vol.42, №3. – P. 185-207.
262. Smith, W.S. Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke Final Results of the Multi MERCI Trial / W.S. Smith, G. Sung, J. Saver [et al.] // *Stroke.* – 2008. – Vol.39. – P. 1205-1212.
263. Sofroniew, M.V. Astrocytes: biology and pathology / M.V. Sofroniew, H.V. Vinters // *Acta Neuropathol.* – 2010. – Vol.119, №1. – P. 7-35.
264. Spivak, J.L. Serum immunoreactive erythropoietin in health and disease / J.L. Spivak // *J Perinat Med.* – 1995. – Vol.23, №1-2. – P. 13-17.
265. Sraer, J. Prostaglandin synthesis by mesangial and epithelial glomerular cultured cells / J. Sraer, J. Foidart, D. Chansel [et al.] // *FEBS Lett.* – 1979. – Vol.104, №2. – P. 420-424.
266. Starkman, P.S. A Phase 1 Study of Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia / P.S. Starkman, G.R. Duckwiler, T. Grobelny [et al.] // *Stroke.* – 2004. – Vol.35. – P. 2848-2854.
267. Stermer, A.B. The evolution of transcranial laser therapy for acute ischemic stroke, including a pooled analysis of NEST-1 and NEST-2 / A.B. Stermer, B.N. Huisa, J.A. Zivin // *Curr Cardiol Rep.* – 2010. – Vol.12. – P. 29-33.
268. Streeter, J. Mechanisms of action of light therapy for stroke and acute myocardial infarction / J.Streeter, L.De Taboada, U. Oron// *Mitochondrion.* – 2004. – Vol.4, №5-6. – P. 569-576.
269. Sugawa, M. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation / M. Sugawa, Y. Sakurai, Y. Ishikawa-Ieda [et al.] // *Neurosci Res.* – 2002. – Vol.44. – P. 391-403.
270. Swanson, R.A. Astrocyte influences on ischemic neuronal death / R.A. Swanson, W. Ying, T.M. Kauppinen // *Curr Mol Med.* – 2004. – Vol. 4, №2. – P. 193-205.
271. Tajiri, N. Stem cell recruitment of newly formed host cells via a successful seduction? Filling the gap between neurogenic niche and injured brain site / N.Tajiri, Y.Kaneko, K. Shinozuka [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol.8, №9. – P. e74857.

272. Taoufik, E. TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury / E. Taoufik, E. Petit, D. Divoux [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – Vol.105, №16. – P. 6185-6190.
273. The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke // *Lancet.* – 1997. – Vol.349, №9065. – P. 1569-1581.
274. Tuby, H. Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart / H. Tuby, L. Maltz, U. Oron // *Lasers Surg Med.* – 2011. – Vol.43, №5. – P. 401-409.
275. Velasco, M. Excitotoxicity: An Organized Crime at The Cellular Level / M. Velasco, J. Rojas-Quintero, M.Chávez-Castillo [et al.] // *J Neurol Neurosci.* – 2017. – Vol. 8, №3. – P. 193.
276. Venketasubramanian, N. Stroke Epidemiology in South, East, and South-East Asia: A Review / N.Venketasubramanian, B.W.Yoon, J. Pandian [et al.] // *J Stroke.* – 2017. – Vol.19, №3. – P. 286-294.
277. Veys, N. Internal medicine, renal anemia and erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) / N. Veys, W. Van Biesen, N. Lameire [et al.] // *Acta Clin Belg.* – 2007. – Vol.62. – P. 396-407.
278. Villa, P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis / P. Villa, P. Bigini, T. Mennini [et al.] // *J. Exp Med.* – 2003. – Vol.198. – P. 971-975.
279. Waltenberg, J. Modulation of growth factor action. Implications for the treatment of cardiovascular diseases / J. Waltenberg // *Circulation.* – 1997. – Vol. 96. – P. 4083-4094.
280. Wang, L. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration / L. Wang, Z.G. Zhang, R.L. Zhang [et al.] // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 26, №22. – P. 5996-6003.
281. Wang, L. Tumor necrosis factor α primes cerebral endothelial cells for erythropoietin-induced angiogenesis / L. Wang, M. Chopp, H. Teng [et al.] // *J. Cereb.*

Blood Flow Metab. – 2011. – Vol.31, №2. – P. 640-647.

282. Wang, W. Neuroprotective Effect of Scutellarin on Ischemic Cerebral Injury by Down-Regulating the Expression of Angiotensin-Converting Enzyme and AT1 Receptor / W. Wang, X. Ma, J. Han [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol.11, №1. – P. e0146197.

283. Wang, X. Investigational anti-inflammatory agents for the treatment of ischemic brain injury / X. Wang // Expert Opin Investig Drugs. – 2005. – Vol.14. – P. 393-409.

284. Wardlaw, J.M. Does early reperfusion of a cerebral infarct influence cerebral infarct swelling in the acute stage or the final clinical outcome? / J.M. Wardlaw, M.S. Dennis, R.I. Lindley [et al.] // Cerebrovasc. Dis. – 1993. – Vol. 3. – P. 86-93.

285. Wardlaw, J.M. Thrombolysis for acute ischaemic stroke / J.M. Wardlaw, V. Murray, E. Berge [et al.] // Cochrane Database Syst Rev. – 2014. – №7. – CD000213.

286. West, G.A. A new model of cortical stroke in the rhesus macaque / G.A. West, K.J. Golshani, K.P. Doyle [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2009. – Vol.29, №6. – P. 1175-1186.

287. WHO Global Health Observatory: World Health Organization Website [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.who.int/gho/database/en/> (дата обращения: 24.08.2015).

288. Wickrema, A. Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells / A. Wickrema, S.B. Krantz, J.C. Winkelmann [et al.] // Blood. – 1992. – Vol. 80, №8. – P. 1940-1949.

289. Winblad, B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses / B. Winblad // Drug Rev. – 2005. – Vol. 11. – P. 169-182.

290. Witte, O.W. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia / O.W. Witte, H.J. Bidmon, K. Schiene [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2000. – Vol.20. – P.1149-1165.

291. Wood, J.C. Unwinding the path from anemia to stroke / J.C. Wood // Blood. – 2018. – Vol.131, №9. – P. 950-952.

292. Wronski, R. Inhibitory effect of a brain derived peptide preparation on the Ca^{++} -dependent protease, calpain / R. Wronski, P. Tompa, B. Hutter-Paier [et al.] // J Neural Transm. – 2000. – Vol.107. – P. 145-157.
293. Yamaji, R. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA / R. Yamaji, T. Okada, M. Moriya [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1996. – Vol. 239, №2. – P. 494-500.
294. Yang, Z. Low-level laser irradiation alters cardiac cytokine expression following acute myocardial infarction: a potential mechanism for laser therapy / Z. Yang, Y. Wu, H. Zhang [et al.] // Photomed Laser Surg. – 2011. – Vol.29, №6. – P. 391-398.
295. Yasaka, M. Pathophysiology and treatment of cardioembolic stroke / M. Yasaka, C. Yokota, K. Minematsu [et al.] // Nihon Ronen Igakkai Zasshi. – 1998. – Vol.35, №10. – P. 735-740.
296. Yilmaz, G. Cell adhesion molecules and ischemic stroke / G. Yilmaz, D.N. Granger // Neurol Res. – 2008. – Vol.30. – P. 783-793.
297. Yip, K.K. The effect of low-energy laser irradiation on apoptotic factors following experimentally induced transient cerebral ischemia / K.K. Yip, S.C. Lo, M.C. Leung [et al.] // Neuroscience. – 2011. – Vol.190. – P. 301-306.
298. Yip, S. Laser therapy in acute stroke treatment / S. Yip, J. Zivin // Int J Stroke. – 2008. – Vol.3. – P. 88-91.
299. Zhang, H.T. VEGF inhibition attenuates blood-brain barrier disruption in ischemic rat brains by regulating the expression of MMPs / H.T. Zhang, P. Zhang, Y. Gao [et al.] // Mol. Med. Rep. – 2017. – Vol.15, №1. – P. 57-64.
300. Zhang, J. Calcium antagonists for acute ischemic stroke / J. Zhang, J. Yang, C. Zhang [et al.] // Cochrane Database Syst Rev. – 2012. – CD001928.
301. Zhang, L. Effects of a selective CD11b/CD18 antagonist and recombinant human tissue plasminogen activator treatment alone and in combination in a rat embolic model of stroke / L. Zhang, Z.G. Zhang, R.L. Zhang [et al.] // Stroke. – 2003. – Vol.34. – P. 1790-1795.

302. Zhang, L. Ferulic acid ameliorates nerve injury induced by cerebral ischemia in rats / L. Zhang, H. Wang, T. Wang [et al.] // *Exp Ther Med.* – 2015. – Vol.9, №3. – P. 972-976.
303. Zhang, L. Erythropoietin reduces hippocampus injury in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage via targeting matrix metalloprotein-2 / L. Zhang, L. Wang, F.B. Ning [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2017. – Vol.21, №19. – P. 4327-4333.
304. Zhang, M. Efficacy and safety evaluation of edaravone injection in treatment of acute cerebral infarction: a multicenter, double-blind, and randomized controlled clinical trial / M. Zhang // *Chinese J New Drug Clin Remedies.* – 2007. – Vol.26, №2. – P. 105-108.
305. Zhang, X. Protective effect of erythropoietin against myocardial injury in rats with sepsis and its underlying mechanisms / X. Zhang, S. Dong, Y. Qin [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2015. – Vol.11, №5. – P. 3317-3329.
306. Zhao, H. Postacute ischemia vascular endothelial growth factor transfer by transferrin-targeted liposomes attenuates ischemic brain injury after experimental stroke in rats / H. Zhao, X.J. Bao, R.Z. Wang [et al.] // *Hum Gene Ther.* – 2011. – Vol.22. – P. 207-215.
307. Zivin, J.A. Effectiveness and safety of transcranial laser therapy for acute ischemic stroke / J.A. Zivin, G.W. Albers, N. Bornstein [et al.] // *Stroke.* – 2009. – Vol.40. – P. 1359-1364.
308. Zivin, J.A. NeuroThera(R) Efficacy and Safety Trial-3 (NEST- 3): a double-blind, randomized, sham-controlled, parallel group, multicenter, pivotal study to assess the safety and efficacy of transcranial laser therapy with the NeuroThera(R) Laser System for the treatment of acute ischemic stroke within 24 h of stroke onset / J.A. Zivin, R. Sehra, A. Shoshoo [et al.] // *IntJStroke.* – 2014. – №9. – P. 950- 955.