

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской
Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

**Динамика изменения содержания иммунологических маркеров в крови
при поражении головного мозга различного генеза**

Зелененко Мария Александровна

30.06.01 Фундаментальная медицина
03.03.01 Физиология

Научный руководитель
к.м.н. Трашков Александр Петрович

ИЭФБ РАН
Санкт-Петербург 2019

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Одной из ключевых медико-социальных проблем современного здравоохранения являются цереброваскулярные заболевания, а именно острые (локальные) и хронические (глобальные) нарушения мозгового кровообращения (НМК) и их последствия, поскольку в связи с высокой повсеместной распространенностью продолжают оставаться одной из ведущих причин смертности и долговременной инвалидизации населения (3,2 на 1000 населения). В Российской Федерации в 2017 г. было зарегистрировано более 2,6 миллионов человек с цереброваскулярными заболеваниями (Росстат, 2018). В 2013 году было выполнено крупное исследование GBD (Global Burden of Disease) на основании которого сделан вывод о том, что с 1990 года по 2013 год, несмотря на значительные успехи неврологии, нейрофармакологии и смежных наук, общее количество людей, перенесших инсульт увеличилось по всему миру, как мужчин, так и женщин всех возрастов. По эпидемиологическим международным данным (World Development Report) около 6 миллионов человек земного шара ежегодно страдают от инсульта, в России это число насчитывает более 450 000 человек. По сведениям Национального регистра инсульта 31% пациентов, которые перенесли данное заболевание, для ухода за собой нуждаются в посторонней помощи, а 20 % остаются прикованными к постели. И только 8% выживших больных возвращаются к своей работе [1]. Смертность от инсульта среди трудоспособного населения возросла за последние 10 лет более чем на 30% (41 на 100000 населения). Так, по данным исследования (J. F. Meschia et al., 2018) среди людей молодого и среднего возраста (20-64 лет) на сегодняшний день наблюдается примерно 7,2 миллиона случаев ишемического инсульта. Ранняя 30-дневная летальность составляет 16%.

Несмотря на многие вопросы лечения НМК, их осложнений и последствий рассмотрены недостаточно и нуждаются в дополнительных исследованиях. При этом наряду с развитием своевременной и точной диагностики состояния нервной системы и оптимизацией терапевтической тактики, большое значение имеет совершенствование схемы фармакологической коррекции наблюдаемых нарушений и предотвращения осложнений заболевания, основанной на детальном понимании патогенеза поражения головного мозга сосудистого генеза. При этом общность и различие механизмов повреждения головного мозга при локальном и глобальном нарушении церебральной перфузии и их прямое сопоставление изучены слабо. Таким образом, актуальность данного исследования определяется необходимостью детального сопоставления патогенеза этих патологических состояний, что позволит более эффективно применять лечение лекарственными препаратами с нейропротективным действием.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Установить и сравнить клинические и патогенетические особенности поражения головного мозга на моделях локальной и глобальной ишемии у лабораторных крыс.

Задачи исследования:

1. Воспроизвести поражение головного мозга в условиях эксперимента *in vivo* на моделях локальной (ишемический инсульт) и глобальной (хроническое поражение головного мозга) ишемии у лабораторных крыс.
2. Провести комплексное исследование клинических и лабораторных особенностей патогенеза у лабораторных крыс на двух моделях патологического процесса нарушения мозгового кровообращения
3. Провести сравнительный анализ основных нейропротекторных препаратов на показатели летальности животных, объем инфаркта головного мозга, состояние системы крови и эндотелия кровеносных сосудов, динамику показателей нейроспецифических маркеров поражения нервной системы.

Положения, выносимые на защиту

1. Моделирование локальной ишемии посредством полной и необратимой перевязки среднемозговой артерии у лабораторных крыс характеризуется преимущественно ишемическим повреждением головного мозга, значительной динамикой лабораторных маркеров нейронов и нейроглии, формированием верифицируемого инфаркта мозга и сравнительно высокой летальностью подопытных животных в сочетании с умеренными изменениями показателей системы крови и системы гемостаза, а также лабораторных маркеров функциональной активности эндотелия.
2. Моделирование глобальной ишемии посредством двусторонней перевязки сонных артерий у лабораторных крыс характеризуется преимущественно гипоксическим повреждением головного мозга, умеренными изменениями лабораторных маркеров нейронов и нейроглии, отсутствием верифицируемого инфаркта мозга и низкой летальностью подопытных животных в сочетании со значительной динамикой показателей системы крови и системы гемостаза, а также лабораторных маркеров функциональной активности эндотелия.
3. Моделирование локальной ишемии позволяет более точно воспроизвести у лабораторных крыс ишемический мозговой инсульт, а также оценить эффекты антигипоксантных и нейротрофических лекарственных препаратов в рамках защиты головного мозга при острых нарушениях церебральной перфузии.
4. Применение антигипоксантного лекарственного препарата на основе янтарной кислоты уменьшает объема инфаркта мозга и снижает летальность подопытных животных, оказывает сочетанное нейропротективное действие,

путем снижения плазменных концентраций NSE, белка S100b, а также оказывает стимулирующее влияние на костный мозг.

5. Применение нейротрофического лекарственного препарата на основе гидролизата мозга свиньи сопровождается уменьшением объема инфаркта мозга и снижением летальности подопытных животных, оказывает сочетанное нейропротективное действие, путем снижения плазменных концентраций NSE, белка S100b,

6. Применение как антигипоксанта, так и нейротрофического лекарственного препаратов при моделировании локальной ишемии у лабораторных крыс оказывает сочетанное нейропротективное действие, имеющее отсроченный характер для астроцитов. В то же время, особенностью церебропротективного действия антигипоксанта лекарственного препарата на основе янтарной кислоты может являться усиление гемопоза.

7. Результаты экспериментального исследования на лабораторных крысах позволяют обосновать применение антигипоксанта лекарственного препарата на основе янтарной кислоты и нейротрофического лекарственного препарата на основе гидролизата мозга свиньи как в острейшем, так и в остром периодах ишемического мозгового инсульта.

Научная новизна исследования

Впервые проведено детальное сопоставления патогенеза локального нарушения церебральной перфузии посредством полной и необратимой перевязки среднемозговой артерии у лабораторных крыс и глобального нарушения церебральной перфузии посредством двусторонней перевязки сонных артерий у лабораторных крыс и возможности защиты головного мозга путем применения как антигипоксанта, так и нейротрофического лекарственного препаратов как в острейшем, так и в остром периодах ишемического мозгового инсульта.

Теоретическое и практическое значение работы

На основе анализа данных литературы, результатов собственного клинического исследования установлено, что для изучения патогенеза повреждения и возможностей защиты головного мозга при остром ишемическом повреждении в эксперименте на лабораторных крысах целесообразно использовать модель полной и необратимой перевязки среднемозговой артерии; для изучения патогенеза повреждения и возможностей защиты головного мозга при остром гипоксическом повреждении в эксперименте на лабораторных крысах целесообразно использовать модель двусторонней перевязки сонных артерий.; антигипоксанта лекарственный препарат на основе янтарной кислоты и нейротрофический лекарственный препарат на основе гидролизата мозга свиньи целесообразно использовать для изучения возможностей

церебропротекции в эксперименте при моделировании нарушений церебральной перфузии у лабораторных животных.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на Конгрессе с международным участием «Давиденковские чтения» (Санкт-Петербург, 2017), Международном конгрессе, посвященном Всемирному дню инсульта (Москва, 2018), 27th European Stroke Conference (Athens, 2018), Всероссийском терапевтическом конгрессе с международным участием «Боткинские чтения» (Санкт-Петербург, 2019).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 2 печатные работы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Материалы и методы

1. Объект исследования. Информация об уходе, содержании и эвтаназии животных

В исследование были включены 158 самцов альбиносов серых крыс, (*Rattus norvegicus*, John Berkenhout, 1769), массой тела на момент включения – 220-240 г., разведения ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская область). Питомник предоставил ветеринарный сертификат на всю партию поставляемых животных и обеспечивал их доставку в соответствии с правилами транспортировки лабораторных животных.

Подопытные животные после поступления из специализированного питомника проходили 14-дневный период карантина в карантинном блоке вивария с целью исключения из эксперимента животных с соматической и/или инфекционной патологией. После завершения периода карантина, был предусмотрен дополнительный (1 сутки) период адаптации животных к основному помещению вивария. На всем протяжении исследования ежедневно ответственным исполнителем производился осмотр животных с оценкой их состояния: поведение, аппетит, масса тела, состояние шерсти, активность. Результаты осмотра заносились в специальный журнал и визировались руководителем исследования.

Крысы содержались по 4-5 особей в клетке. Клетки стандартные, для содержания лабораторных грызунов. Клетки оборудованы решетчатыми крышками из нержавеющей стали с гнездами-углублениями для установки флакона поилки и для гранулированного корма.

Ограничения в питании и питьевом режиме не вводились. На всем протяжении исследования использовался полноценный, специально разработанный для питания лабораторных грызунов экструдированный и

гранулированный корм (производитель – ООО «Лабораторкорм», Россия). Вода для животных фильтровалась и после заполнения флакона поилки в течение 5 минут облучалась ультрафиолетом. На всем протяжении исследования производился учет количества потребляемого корма и воды.

В качестве подстилочного материала использовались опилки из лиственных пород деревьев, подвергавшиеся предварительной стерилизации в сухожаровом шкафу при 120⁰С в течение 20 минут.

На всем протяжении исследования в помещении, где содержались животные ежедневно, периодически осуществлялся контроль параметров окружающей среды. Световой режим в помещении: 12 часов – свет («день» с 08.00. до 20.00); 12 часов – темнота («ночь» с 20.00 до 08.00). Учитывая суточные колебания основных клинико-физиологических и лабораторных показателей, все эксперименты с подопытными животными начинались в первой половине дня. Температурный режим в помещении: +20⁰С – +22⁰С. Относительная влажность воздуха в помещении: 50-70%. В помещении установлена система приточно-вытяжной вентиляции, предусматривающая режим проветривания 15 объемов помещения в час.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось в герметичном боксе, путем ингаляции диоксида углерода.

2. Правила рандомизации. Обследуемые группы

Рандомизацию животных осуществляли методом случайных чисел. Всем крысам, включенным в исследование, присваивался индивидуальный номер. Случайным образом компьютерная программа отбирала из общей группы животных, то количество, которое соответствует объему выборки, в соответствии с которыми распределяют животных по группам и подгруппам.

Были выделены 5 экспериментальных групп:

Группа №1 – *Контроль* ($n=12$) – интактные животные без признаков инфекционной и/или соматической патологии для анализа нормальных («физиологических») показателей.

Группа №2 – *Локальная ишемия (ЛИ)* ($n=36$) – животные, у которых воспроизводили локальную ишемию головного мозга и проводили терапию 0,9% раствором натрия хлорида с последующим анализом определяемых показателей в контрольных точках исследования.

Группа №3 – *Глобальная ишемия (ГИ)* ($n=30$) – животные, у которых воспроизводили глобальную ишемию головного мозга и проводили терапию 0,9% раствором натрия хлорида с последующим анализом определяемых показателей в контрольных точках исследования.

Группа №4 – *Локальная ишемия + Цитофлавин (ЛИ+Ц)* (40) – животные, у которых воспроизводили локальную ишемию головного мозга и проводили терапию Цитофлавином с последующим анализом определяемых показателей в контрольных точках исследования.

Группа №5 – *Локальная ишемия + Церебролизин (ЛИ+ЦЛЗ)* ($n=40$) – животные, у которых воспроизводили глобальную ишемию головного мозга и

проводили терапию Церебролизином с последующим анализом определяемых показателей в контрольных точках исследования.

3. Моделирование локальной ишемии мозга крыс (модель острого инсульта)

Модель локальной ишемии головного мозга (инсульта) воспроизводится на лабораторных крысах путем необратимого ограничения кровотока в бассейне среднемозговой артерии.

Ход операции. Животное вводится в общий наркоз (инъекционный золетилловый наркоз – 0,1-0,2 мл/животные, внутримышечно) и помещается в специально сконструированную установку, которая позволяет удобно и жестко фиксировать голову в боковом положении кверху. Операцию производят с помощью светооптической увеличивающей аппаратуры с источником искусственного освещения. После удаления шерстного покрова в области операционного поля и его обработки делают разрез кожи по ходу скуловой кости 2-2,5 см длиной. Раневую поверхность расширяют, фиксируют за края раны в открытом положении и обнажают слюнную железу. Слюнную железу вместе с прилегающим сосудистым сплетением аккуратно отделяют от окружающих тканей, мобилизируют и отводят в сторону. После удаления скуловой кости раскрываются края крепления височной мышцы к нижней челюсти и с помощью сверла производится щадящий разрез кости по краю крепления к ней сухожилия указанной мышцы. Далее поднимают с помощью крючков нижний край височной мышцы кверху, при этом обнажается височная ямка, дно которой образует крыловидная мышца с проходящим рядом нижнечелюстным нервом. С помощью ранорасширителя раздвигается крыловидная мышца, вследствие чего открывается поверхность черепа между овальным отверстием и отверстием зрительного нерва. В этой области сверлится отверстие диаметром 2 мм и обнажается место расположения среднемозговой артерии. Под левую среднюю мозговую артерию подводят иглу с нитью толщиной 10/0, прокалывая иглой твердую мозговую оболочку и мобилизируют артерию путем образования лигатуры. Перевязку среднемозговой артерии проводят у ее основания. После перевязки ток крови по средней мозговой артерии прекращается, что можно визуально наблюдать. Края раны послойно ушиваются. Животное помещается в изолятор для послеоперационного содержания и наблюдения. Период изолированного содержания оперированных животных не превышал 1 сутки.

4. Моделирование глобальной ишемии головного мозга

Модель глобальной ишемии головного мозга (острое и хроническое нарушение мозгового кровообращения без верифицированного очага инфаркта мозга) воспроизводится на лабораторных крысах путем необратимого ограничения кровотока в бассейнах сонных артерий в сочетании с одновременной массивной кровопотерей.

Ход операции. Животное вводится в наркоз (инъекционный золетилловый наркоз – 0,1-0,2 мл/животные, внутримышечно) и фиксируется в положении на спине. Удаляют шерсть на шее животного и проводят линию, соединяющую угол нижней челюсти крысы и верхний край грудины. Производят по линии разрез кожи и подкожной фасции из точки на 0,5 см ниже угла нижней челюсти до точки, лежащей на 0,5 – 0,25 см выше верхнего края грудины животного. Осторожно раздвигают фасции и мышцы шеи крысы и последовательно обнажают, мобилизируют и перевязывают обе сонные артерии. Края раны послойно ушиваются.

После этого, производят быстрое, одномоментное взятие крови в объеме 3 мл, что соответствует кровопотери в объеме 21–27% от ОЦК животного. Гипотензия необходима для моделирования ишемии мозга, так как двусторонняя перевязка общих сонных артерий не обеспечивает понижения мозгового кровотока до величин, при которых гарантировано развивается гипоксическое/ишемическое поражение.

5. Введение исследуемого препарата

Препарат вводили внутривенно, в объеме 0,2 мл препарата растворенного в 0,2 мл физиологического раствора (расчет на 1 животное массой тела 220-240 г). Скорость введения препарата – не более 0,5 мл/мин. Животным групп «Локальная ишемия» и «Глобальная ишемия» вводили 0,9% раствор натрия хлорида в объеме эквивалентном объему вводимого лекарственного препарата – 0,4 мл, с такой же скоростью введения – не более 0,5 мл/мин. Терапия патологических процессов проводилась в течение 7 суток от момента моделирования заболевания. Первое введение производилось через 1 час после моделирования заболевания.

6. Контрольные точки исследования

Основные экспериментальные данные получали в контрольных точках исследования: 1, 3, 7 сутки от момента моделирования заболевания. Выбор таких временных интервалов обусловлен большим опытом научного коллектива работы на используемых моделях поражения нервной системы у крыс. Контрольные точки в наибольшей степени эквивалентны острейшему, острому и отсроченному периодам повреждения головного мозга сосудистого генеза.

7. Методы взятия биологического материала для последующего анализа

Взятие биологического материала для анализа производили в контрольных точках исследования. Взятие крови производили в начале светового периода суток, без предварительного ограничения доступа животных к корму и воде.

Животное вводилось в общий наркоз (инъекционный золетилловый наркоз – 0,1-0,2 мл/животные, внутримышечно) и фиксировалось марлевыми вязками за конечности и верхнюю челюсть на операционном столике. Пальпаторно определяли положение верхушки сердца в проекции на грудную клетку животного. Область грудной клетки дезинфицировали (70%-й раствор этилового спирта).

Взятие крови производили в вакуумные системы Monovette (SARSTEDT, Германия) следующим образом. Специальная игла надевается проколом на шприцевую систему системы Monovette и освобождается от защитного пластикового кожуха. Игла вводится в камеру сердца в проекции верхушки сердца. После вхождения в камеру сердца (определяется по ритмичным колебаниям иглы) вручную, при помощи шприца-Monovette с антикоагулянтом (КЗ-ЭДТА или цитрат натрия) медленно производится взятие крови в объеме 5,0 мл. Завершив процедуру, быстрым движением выводят иглу из сердца и, удерживая шприц-Monovette в вертикальном положении, снимают иглу, отводят поршень шприца-Monovette до крайне нижнего положения и отламывают его у основания шприца. Вакуумная пробирка осторожно переворачивается 2–3 раза для полного перемешивания крови и антикоагулянта, устанавливается в штатив и может быть подвергнута дальнейшей обработке.

Взятие головного мозга. После окончания взятия крови крысу освобождали от марлевых вязок, переворачивали в положение «лежа на животе» и производили быстрое вскрытие черепной коробки животного. Головной мозг осторожно извлекали и подвергали дальнейшей обработке в соответствии с общепринятыми правилами.

8. Описание используемых лабораторных методов исследования биологического материала

Общий клинический анализ крови (ОКК)

ОКК определяли с помощью гематологического анализатора Mythic 18 («Orphee SA», Швейцария), используя наборы реактивов фирмы «J.T.Baker» (США). Оценивали: гематокрит (HCT), гемоглобин (HGB), эритроциты (RDW), ретикулоциты (RTC), эритроцитарный анизоцитоз (RDW), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), лейкоциты и их популяции (WBC и гранулоциты (GRA), лимфоциты (LYM) и моноциты (MON)), тромбоциты (PLT) и их средний объем (MPV).

Гемостазиологические исследования

Показатели системы свертывания крови определяли с помощью коагулометра АПГ 2-02-П (ЗАО НПП «Техномедика», Россия), используя наборы реагентов НПО «Ренам» (Россия). Определяли: Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), Протромбиновое время (ПВ), Тромбиновое время (ТВ), Фибриноген. Мануальным методом определяли уровень растворимых комплексов мономерного фибрина (РКМФ),

качественный этаноловый тест) и продолжительность эуглобулинового фибринолиза (ЭФ, при помощи реагентов реагентов НПО «Ренам»).

Исследование агрегационной активности тромбоцитов проводили при помощи двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов BIOALA-230LA (ООО НПФ «Биола», Россия) фотометрическим методом по Born G.V.R. (1962) [7] в модификации Габбасова З.А. (1989) [8]. В качестве отправной точки агрегации принимали оценку светопропускания ОТП = 0%. Исследование агрегации проводили в ОТП. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ (НПО «Ренам», Россия) в концентрации 2,5 мкМ. Оценку агрегатограмм проводили по следующим параметрам: максимальная амплитуда агрегации (МА) в % и время достижения максимальной агрегации (ВМА) в секундах.

Анализ функции эндотелия

Уровень функциональной активности эндотелия оценивали по динамике основных маркеров – эндотелиальный сосудистый фактор роста (увеличение митотической и локомоторной активности эндотелиоцитов), оксид азота (регионарный вазодиллятор) и эндотелин-1 типа (регионарный вазоконстриктор). Уровень VEGF, NO и эндотелина-1 в крови животных определяли методом ИФА, используя наборы реактивов компании «Cusabio» (Китай), в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ объема поражения коры головного мозга

Объем поражения коры полушария головного мозга крыс производили общепринятым способом.

Для замороженного при -20°C головного мозга животных готовили фронтальные срезы толщиной около 2,5 мм. Срезы окрашивали в 0,5% растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) при температуре 37°C в течение 30 мин. Срезы фиксировали 10% раствором нейтрального забуференного формалина.

Срезы сканировали и планиметрически определяли объем поражения коры полушария головного мозга.

Анализ содержания в крови крыс нейронспецифических маркеров

Состояние функциональной активности клеток нервной ткани оценивали по динамике основных маркеров – нейронспецифическая енолаза (NSE) и белок s100b, широко используемых в клинической практике. Уровень NSE и s100b в крови животных определяли методом ИФА, используя наборы реактивов компании «Cusabio» (Китай), в соответствии с инструкцией производителя

Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка производилась при помощи пакета программ SPSS for Windows. Данные приведены в виде $M \pm SD$ (средняя арифметическая \pm среднее квадратическое отклонение) или $Me (QQ)$ (медиана и квартили) в зависимости от характера распределения. Проверка характера распределения

данных производилась расчетом критерия Колмогорова-Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок производилось при помощи t-критерия Стьюдента (при нормальном характере распределения вариантов в выборочной совокупности) и U-критерия Манна-Уитни (при распределении вариантов в выборочной совокупности, отличном от нормального). Сравнение средних данных зависимых выборок производилось при помощи χ^2 -критерия Фридмана. Корреляционный анализ производился при помощи критерия Спирмена.

Достоверным уровнем отличий будет считаться вероятность не менее 95% ($p < 0,05$), что является стандартом в медико-биологических исследованиях.

Результаты и обсуждение

1. Сравнительная оценка особенностей патогенеза поражения головного мозга при моделировании локальной и глобальной ишемии головного мозга у крыс

Моделирование острой, необратимой сосудистой катастрофы различного объема и интенсивности воздействия приводило к значительным структурно-функциональным изменениям в тканях головного мозга крыс и выраженному напряжению защитных и адаптивных систем организма.

Интегральным показателем, позволяющим оценить степень тяжести патологического процесса и, как следствие, уровень напряженности используемой модели, является уровень летальности крыс в обследуемых группах (табл.1).

Таблица 1. Летальность подопытных крыс с поражением головного мозга ишемического генеза

Группа (n)	Летальность		
	Кол-во павших особей	Процент от исходного объема выборки в группе	95% ДИ
Контроль (12)	<i>Летальность не фиксировалась на всем протяжении исследования</i>		
Локальная ишемия (36)	13	36	20,8 – 53,8
Глобальная ишемия (30)	6	20	7,7 – 38,6
<i>n – число особей крыс в экспериментальной группе,</i>			

Летальность животных в группе ЛИ составляла 36%, при этом все животные погибали в первые 72 часа после моделирования заболевания (острейший и острый периоды). Летальность животных в группе ГИ составляла 20% и все случаи гибели крыс регистрировались в первые 24 часа после моделирования (острейший период).

Высокая летальность животных в группе ЛИ дополнялась данными клинического обследования крыс. Регистрировались различные проявления неврологического дефицита и когнитивных нарушений – заторможенность, снижение общей локомоторной и поисковой активности, силы хвата конечностей. Указанные нарушения являлись отражением глубоких

структурно-функциональных нарушений работы головного мозга крыс и практически полностью исчезали через 72 часа от момента моделирования инсульта, что свидетельствует о значительном напряжении адаптивных и защитных систем организма животных.

Очаг инфаркта головного мозга, который определялся на 1-е сутки при патоморфологическом исследовании, у крыс с локальной ишемией регистрировался в 100% случаев и в среднем составлял 24%. В группе у крыс с глобальной ишемией очаг не регистрировался.

Анализ результатов исследования состояния системы крови крыс с локальной и глобальной ишемией головного мозга установил характерные для данного патологического процесса изменения гематологических показателей, инициированные развитием гипоксии нервной ткани.

Состояние эритроидного ростка кроветворения у животных с локальной ишемией характеризовалось умеренными изменениями, как правило, не имеющими большого клинического значения. В первые сутки заболевания регистрировалась умеренная тенденция к увеличению гематокрита у крыс с инсультом по сравнению с контрольной группой (в группе контроль $M=42,9167\%$, в группе ЛИ $M=48,5000\%$, $p=0,082$), связанная с выраженными гемодинамическими сдвигами и выходом в кровоток депонированных клеток в периоперационный период. В дальнейшем наблюдалось быстрое восстановление данного показателя ($p>0,05$). Аналогичная картина наблюдалась при анализе динамики содержания гемоглобина и общего уровня эритроцитов у крыс с локальной ишемией головного мозга.

Иначе обстояли дела с уровнем ретикулоцитов в крови, а именно наблюдалось достоверно значимое увеличение данного показателя у крыс в группе ЛИ на 1-е сутки, в среднем на 2,8% ($p=0,039$). Однако, вероятно, эти изменения обусловлены теми же причинами, которые привели к увеличению общего гематокрита – гемодинамические сдвиги и выход клеток крови из депо в острейший период инсульта. В дальнейшем, уровень ретикулоцитов быстро нормализовался ($p>0,05$).

Показатель «эритроцитарный анизоцитоз», являющийся общей характеристикой популяции эритроидных клеток в крови крыс не претерпевал каких-либо существенных изменений в группе ЛИ во всех точках исследования ($p>0,05$).

Изменения среднего объема эритроцитов периферической крови крыс с локальной ишемией также не имели достоверных изменений и на всем протяжении исследования не отличались от контрольных значений ($p>0,05$).

Интересные результаты были получены при анализе динамики среднего содержания гемоглобина в эритроците. На 7 сутки эксперимента в группе ЛИ наблюдалось значимое снижение этого показателя на 3,44 пг ($p=0,012$).

Патогенез поражения головного мозга на модели глобальной гипоксии (хроническое нарушение мозгового кровообращения без верифицированного очага инфаркта мозга) в значительно большей степени включал в себя нарушения со стороны эритроидного ростка кроветворения, что отражало высокий, слабо купируемый в течение эксперимента, уровень гипоксии тканей

мозга. Общее количество форменных элементов (гематокрит, НСТ) у крыс группы ГИ умеренно увеличивалось в течение периода наблюдений и на 7 сутки статистически значимо отличалось от контрольных значений в среднем на 4,08% ($p=0,048$). Существенных, клинически значимых изменений содержания гемоглобина и общего количества эритроцитов в крови подопытных животных с глобальной ишемией не наблюдалось.

Выраженные, клинически значимые изменения наблюдались при анализе результатов оценки содержания в крови животных с глобальной гипоксией ретикулоцитов – маркеров активности красного костного мозга. В группе ГИ наблюдался подъем количества ретикулоцитов, достоверно на 3,10% (3 сутки; $p=0,046$) и на 2,90% (7 сутки; $p=0,036$) превышающий контрольные значения в указанные интервалы времени.

Достоверное увеличение количества ретикулоцитов, клеток, отличающихся по диаметру от эритроцитарных нормоцитов, на фоне глобальной ишемии головного мозга у крыс приводило к росту показателя «эритроцитарный анизоцитоз». Учитывая объективную взаимосвязь этих двух показателей состояния эритроидного очага кроветворения, динамика уровня анизоцитоза эритроцитов, регистрируемая в группах животных с глобальной ишемией, была сходной с картиной, наблюдаемой при анализе содержания ретикулоцитов в крови подопытных крыс, к 7-м суткам данный показатель выше на 5,86% ($p=0,030$) по сравнению с контрольной группой.

Статистически значимое увеличение продукции ретикулоцитов у животных с глобальной ишемией головного мозга также имело следствием увеличение среднего объема циркулирующих эритроцитов в крови крыс. MCV у крыс на 7,10 фл (3 сутки; $p=0,022$) и 6,00 фл (7 сутки; $p=0,037$) превышало контрольные значения в указанный период.

Динамика среднего содержания гемоглобина в эритроците у крыс с глобальной ишемией имело незначительную тенденцию к увеличению.

Анализ изменений популяции лейкоцитов в крови крыс на обеих моделях заболевания не выявил клинически значимых изменений. Регистрируемые значимые отличия между отдельными показателями групп имеют, вероятно, случайный характер, который связан с перераспределением кровотока, высокой вариативностью данных и не отражаются на течении патологического процесса и его исходах.

Патологические процессы, вызванные локальной и глобальной ишемией головного мозга крыс, приводили к определенным изменениям в работе тромбоцитарного компонента крови животных. На используемых моделях поражения ЦНС наблюдалось разнонаправленное изменение общего количества тромбоцитов в крови подопытных животных. Так, при моделировании инфаркта мозга наблюдалось незначительное и достоверно незначимое уменьшение изучаемого показателя, тогда как при глобальной ишемии головного мозга отчетливо прослеживалась тенденция к росту числа тромбоцитов в единице объема крови крыс. На 7 сутки эксперимента этот показатель у животных группы ГИ был достоверно выше, чем в контрольной группе на $234,17 \text{ cell} \times 10^9/l$ ($p=0,002$).

Такие изменения можно объяснить существенными различиями в патогенезе обследуемых моделей поражения головного мозга. На модели локальной ишемии общее кровоснабжение органа нарушено в незначительной степени и, преимущественно, в бассейне перевязанного сосуда, где сформировался очаг инфаркта мозга. Несмотря на гипоксию тканей мозга в этой области, усиление активности красного костного мозга практически не фиксировалось, а сравнительное умеренное снижение количества тромбоцитов в крови подопытных животных можно объяснить их потреблением при ограничении и санации очага повреждения. На модели глобальной ишемии головного мозга крыс, напротив, нарушения кровообращения затрагивали практически все ткани и отделы органа, без формирования визуально-определяемого очага поражения. На первый план здесь выходят гипоксические изменения в нервной ткани, обеспечивающие увеличение регенераторного потенциала костного мозга и, как следствие, увеличение продукции форменных элементов.

Несмотря на статистически значимые в определенные периоды наблюдений колебания общего количества тромбоцитов в крови, их средний объем, являющийся косвенным показателем однородности популяции этого типа форменных элементов крови животных, менялся слабо. Наблюдаемые различия клинически не значимы, вероятно, носят случайный характер и являются артефактами исследования.

Сравнительно небольшие изменения содержания тромбоцитов в единице объема крови животных и их размеров с локальной ишемией головного мозга не приводили к существенным изменениям со стороны агрегационной активности форменных элементов. На всем протяжении эксперимента статистически значимых отличий между обследованными группами крыс с локальной ишемией мозга по показателям АДФ-индуцированная максимальная амплитуда агрегации тромбоцитов и время достижения АДФ-индуцированной максимальной амплитуд агрегации тромбоцитов не регистрировалось.

В противоположность этому выраженная положительная динамика количественных показателей тромбоцитарного компонента популяции форменных элементов крови (PLT, MPV) у крыс с глобальной ишемией головного мозга сопровождалась нарастанием агрегационной активности тромбоцитов. На 7-е сутки эксперимента у животных группы ГИ АДФ-индуцированная максимальная амплитуда агрегации тромбоцитов была выше, чем у интактных крыс на 9,54 % ($p=0,004$).

Напряженность используемых моделей поражения головного мозга крыс подтверждается значительной вовлеченностью в патогенез воспроизводимых патологических процессов защитным и адаптивных систем организма животных, например, системы свертывания крови. Патогенез гиперкоагулопатии развивается преимущественно по механизмам внутреннего каскада свертывания, что отражается в динамике теста АЧТВ у крыс и при локальной, и при глобальной ишемии головного мозга.

Длительность активированного частичного тромбопластинового времени у этих животных достоверно снижалась уже в первые дни после моделирования заболевания и не восстанавливалась до контрольных значений на всем протяжении эксперимента. Так при локальной ишемии к 3-м суткам длительность АЧТВ была в среднем меньше на 12,55 с ($p=0,016$), к 7-м суткам на 6,47 с ($p=0,044$) (рис 8). На модели глобальной ишемии отмечалось снижение АЧТВ уже на 1-е сутки на 7,94 ($p=0,049$), на 3-и сутки на 13,7 ($p=0,014$) и на 2-е сутки на 16,08 с ($p=0,012$).

Вовлеченность механизмов внешнего каскада системы свертывания на используемых моделях поражения мозга оказалась неожиданно низкой. На всем протяжении экспериментов, как на модели локальной ишемии, так и на модели глобальной ишемии головного мозга крыс показатели протромбинового времени у различных обследуемых групп животных были статистически сопоставимы. Низкая активность процессов внешнего каскада системы свертывания, являющегося основным индуктором и локомотивом механизмов коагуляции приводила к слабой активации общего пути свертывания, отраженного в тесте «тромбиновое время», особенно на модели локальной ишемии головного мозга у крыс. На всем протяжении исследования существенных, клинически значимых изменений продолжительности ТВ у животных с локальной ишемией не наблюдалось.

Патогенез глобальной ишемии головного мозга в значительно большей степени включает в себя нарушения работы общего каскада системы свертывания. У крыс группы ГИ в ходе эксперимента наблюдалась умеренная тенденция к уменьшению продолжительности теста ТВ, не достигающая, однако статистически значимого уровня отличий с показателями контрольной группы даже на 7 сутки от момента моделирования заболевания.

Анализ содержания в крови подопытных животных фибриногена не выявил клинически значимых изменений этого показателя. Статистически значимое увеличение концентрации фибриногена в крови крыс группы ГИ на 3 сутки ($p=0,028$) эксперимента является транзиторным феноменом, во многом обусловленным вариативностью изучаемого показателя и общим увеличением фибриногенемии в послеоперационный период.

В группах крыс с локальной ишемией головного мозга динамика теста «эуглобулиновый фибринолиз» - интегрального показателя активности фибринолитической системы была незначительной. Более выраженная картина нарушений работы фибринолиза наблюдалась при анализе этого показателя у животных с глобальной ишемией. В группе ГИ происходило постепенное достоверное увеличение длительности эуглобулинового фибринолиза, что указывает на нарушение фибринолитического потенциала крови и нарастание риска гемостазиологических нарушений. На 3 сутки изучаемый показатель превышал контрольные значения в среднем на 47,6 мин ($p=0,006$), на 7 сутки – на 39,2 мин ($p=0,034$).

Неотъемлемым компонентом патогенеза поражения головного мозга ишемического генеза является развитие эндотелиальной дисфункции, проявляющееся нарушением баланса между вазодилатирующими и

вазоконстрикторными соединениями и продукции факторов-регуляторов клеточного цикла и активности эндотелиоцитов. Указанный каскад нарушений был в значительно большей степени выражен на модели глобальной ишемии головного мозга у крыс.

У животных с локальной ишемией головного мозга наблюдалась слабо выраженная, статистически недостоверная тенденция к снижению общей продукции оксида азота (NO), продукция которого в крови обеспечивается преимущественно эндотелием сосудов.

У животных с глобальной ишемией головного мозга, напротив, наблюдалось выраженное, статистически значимое уменьшение уровня оксида азота в крови, регистрируемое на всем протяжении исследования на 1-е сутки на 44,33 мкмоль/л ($p=0,028$), 2-е сутки на 69,92 мкмоль/л ($p=0,007$) и на 7-е сутки показатель уменьшался в среднем на 47,91 мкмоль/л ($p=0,054$).

Динамика изменений концентрации эндотелина-1 (ET-1) – основного местного вазоконстриктора, продуцируемого преимущественно в эндотелии сосудов, напротив была более выраженной на обеих моделях поражения головного мозга крыс. На всем протяжении исследования уровень ET-1 у крыс с локальной ишемией был значительно повышен по сравнению с контрольными значениями, однако достоверно значимые различия отмечались на 1-е и 7-е сутки. На 1 сутки эксперимента он был больше в среднем на 0,86 фмоль/л ($p=0,015$), на 3 сутки – на 0,44 фмоль/л ($p=0,351$) и на 7 сутки – на 1,10 фмоль/л ($p=0,003$).

Аналогичная картина наблюдалась при анализе результатов определения уровня ET-1 у нелеченных крыс с глобальной ишемией головного мозга. На 1 сутки эксперимента он был больше чем в группе контрольных животных в среднем на 1,29 фмоль/л ($p=0,004$), на 3 сутки – на 1,28 фмоль/л ($p=0,007$) и на 7 сутки – на 1,15 фмоль/л ($p=0,013$).

Динамика содержания сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) на обеих моделях поражения головного мозга ишемического генеза была неожиданно слабой. В острейший и острый периоды заболевания наблюдалась тенденция к снижению концентрации этого цитокина в крови подопытных крыс как в группе с локальной ишемией, так и в группе с глобальной ишемией.

Структурно-функциональные нарушения головного мозга крыс на моделях инсульта (локальная ишемия) и острого и хронического нарушения мозгового кровообращения без верифицированного очага инфаркта мозга (глобальная ишемия) нашли отражение в динамике нейроспецифических маркеров, отражающих степень вовлеченности тканей мозга в патологический процесс.

Наиболее выраженные изменения наблюдались у крыс группы ЛИ. Так, уровень нейронспецифической енолазы (NSE) у животных указанной группы был достоверно повышен на 3 и 7-е сутки. На 3 сутки он превышал контрольные значения в среднем – на 5,54 мкг/л ($p=0,020$) и на 7 сутки – на 3,90 мкг/л ($p=0,037$).

Параллельно наблюдалось увеличение содержания в крови подопытных животных другого специфического маркера поражения нервной ткани – белка s100b. На 1 сутки его концентрация превышала контрольные значения, полученные у интактных крыс, в среднем на 0,43 пг/л ($p>0,05$), на 3 сутки – на 0,76 пг/л ($p=0,012$) и на 7 сутки – на 0,40 мкг/л ($p=0,052$).

Картина изменений содержания NSE и белка s100b в крови подопытных животных с глобальной ишемией головного мозга была сходной с таковой, наблюдаемой на предыдущей модели патологического процесса. Однако интенсивность наблюдаемых нарушений оказалась менее выраженной.

2. Особенности механизмов экзогенной церебропротекции антигипоксантами препаратом при моделировании локальной ишемии головного мозга

Летальность животных в группе локальная ишемия составляла 36%, терапия острого нарушения церебральной перфузии препаратом цитофлавин – антигипоксантами лекарственного препарата на основе янтарной кислоты приводила к тенденции к уменьшению летальности подопытных животных, которая составила 20% ($p=0,19$) (таб.2).

Таблица 2. Влияние препарата цитофлавин на летальность подопытных крыс с локальной ишемией

Группа (n)	Летальность		
	Кол-во павших особей	Процент от исходного объема выборки в группе	95% ДИ
Локальная ишемия (36)	13	36	20,8 – 53,8
Локальная ишемия + ЦФ (40)	8	20	9,1 – 35,7

Терапия инсульта данным препаратом приводила к выраженной тенденции к уменьшению объема поражения мозга крыс подопытных животных – в среднем в 1,54 раза ($p=0,114$).

Состояние эритроидного ростка кроветворения у животных с локальной ишемией на фоне проводимой терапии характеризовалось умеренными изменениями, как правило, не имеющими большого клинического значения.

Терапия инсульта препаратом цитофлавин не приводила к значительному изменению динамики уровня гематокрита у крыс. Аналогичная картина наблюдалась при анализе динамики содержания гемоглобина и общего уровня эритроцитов у крыс с локальной ишемией головного мозга в группе ЛИ+ЦФ.

На модели локальной ишемии наблюдалось достоверное увеличение содержания ретикулоцитов на 1-е сутки в крови крыс с дальнейшим быстрым восстановлением показателя, что можно объяснить гемодинамическим сдвигом и выходом клеток крови из депо. Терапия препаратом цитофлавин не приводила к значительному изменению содержания ретикулоцитов в крови в группе ЛИ+ЦФ по сравнению с группой ЛИ, однако отмечалось достоверное

увеличение данного показателя на всем протяжении исследования по сравнению с содержанием ретикулоцитов в крови интактных животных. Так, на 1-е сутки этот показатель в группе ЛИ+ЦФ был выше на 5,34 %/RBC ($p=0,021$), на 3-и сутки на 4,66 %/RBC ($p=0,003$) и на 7-е сутки на 2,74 %/RBC ($p=0,005$). Увеличение содержания ретикулоцитов обусловлено активностью процессов эритропоэза, вероятно вследствие стимуляции красного костного мозга препаратом цитофлавин, что является одним из важных факторов улучшения кислородтранспортной функции крови.

С ростом ретикулоцитов в группе ЛИ+ЦФ также выявлялось достоверное повышение среднего объема эритроцитов (MCV) по отношению к контрольной группе и группе нелеченых животных с инсультом. По сравнению с группой контроль отмечался рост показателя MCV во всех точках исследования, на 1-е сутки на 8,74 fl ($p=0,006$), на 3-и сутки на 8,25 fl ($p=0,014$) и на 7-е сутки на 7,02 fl ($p=0,009$). По сравнению с группой ЛИ MCV был также выше во всех контрольных точках, однако отличия были на достоверно принятом уровне значимости на 1-е сутки на 7,2 fl ($p=0,016$) и на 7-е сутки на 8,32 fl ($p=0,003$).

Фиксировалось увеличение показателя изменения среднего размера эритроцита (эритроцитарный анизоцитоз) в группе ЛИ+ЦФ только на 1-е сутки исследования по сравнению с группой контроль в среднем на 4% ($p=0,036$) с последующим быстрым восстановлением показателя до контрольных значений.

Плотность эритроцитов определяется концентрацией в них гемоглобина. Наиболее легкими и, следовательно, наименее плотными являются молодые эритроциты (ретикулоциты), поэтому несмотря на увеличение содержания ретикулоцитов на фоне применения препарата цитофлавин динамика среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH) в крови подопытных животных не имела значимых изменений.

Что касается работы тромбоцитарного компонента крови животных, терапия экспериментального инсульта препаратом цитофлавин способствовала умеренному увеличению содержания тромбоцитов в периферической крови животных, которое носило, вероятно, перераспределительный характер и было обусловлено гемодинамическим действием препарата.

При достоверно незначимом изменении тромбоцитов в крови при локальной ишемии на фоне применения препарата цитофлавин в группе ЛИ+ЦФ отмечалось повышение юных форм тромбоцитов, отличающихся большим размером, что отражалось в увеличении динамики уровня анизоцитоза тромбоцитов (PDW, %) и на средний объем тромбоцитов (MPV, fl) в крови подопытных животных. Так, показатель PDW был выше на 1-е сутки по сравнению группой контроль на 1,42% ($p=0,027$), и группой локальная ишемия на 1,65% ($p=0,008$), MPV также на 1-е сутки был выше на 0,64 fl ($p=0,041$) у нелеченных животных с моделью инсульта. Таким образом, цитофлавин усиливает тромбоцитопоэз, что приводит к возрастанию доли больших тромбоцитов с одновременным расширением диапазона их

распределения, т.е. одновременное возрастание и MPV, и PDW. Указанные отличия не могут быть объяснены в рамках настоящего исследования.

Качественный и количественный анализ лейкоцитарной формулы крови подопытных животных выявил для модели локальной ишемии тенденцию к повышению количества лейкоцитов в сравнении с показателями группы контроль, преимущественно, за счет гранулоцитоза. В группе ЛИ+Ц увеличение общего содержания лейкоцитов в крови животных наблюдалось в острейший и острый периоды инсульта по отношению к группе контроль, на 1-е сутки на $13,3 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,016$), на 3-и сутки на $1,96 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,01$) и на 1-е сутки на $11,42 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,003$) по отношению к группе ЛИ. При этом в отсроченный период на 7-е сутки в группе ЛИ+Ц отмечалось снижение уровня лейкоцитов на $0,32 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,023$). Количество гранулоцитов также было повышено во всех контрольных точках у крыс на фоне лечения препаратом цитофлавин, однако достоверные изменения значений наблюдались на 1-е сутки на 5,25% ($p=0,051$).

Содержание гранулоцитов в крови отражает состояние циркулирующего пула гранулоцитов, которое определяется балансом трех факторов: высвобождением из костного мозга, потерей в тканях и маргинацией гранулоцитов в крови. Цитофлавин, наиболее вероятно стимулирует мобилизацию из маргинированного пула, которая приводит к умеренному лейкоцитозу.

При оценке функциональной активности эндотелия кровеносных сосудов при лечении цитофлавином на фоне развития локальной ишемии во всех точках исследования достоверных отличий в динамике содержания VEGF – основного эффектора пролиферации эндотелиоцитов не установлено.

Препарат цитофлавин оказал выраженное сочетанное нейропротективное действие на модели локальной ишемии головного мозга крыс, которое выразилось в уменьшении содержания нейроспецифических маркеров уже на 1 сутки от момента моделирования заболевания. На всем протяжении исследования, уровни NSE и белка S100b у животных с инсультом, получавших лечение изучаемым препаратом были сопоставимы с показателями, полученными у интактных животных. Так, показатель NSE в крови у леченных животных на 1-е сутки был ниже на 2,27 мкг/л ($p=0,003$) по сравнению с группой ЛИ и продолжал снижаться в оставшихся контрольных точках. Аналогичная картина наблюдалась с уровнем показателя белка S100b по сравнению с группой ЛИ, на 1-е сутки он уменьшался на 6,57 пг/мл ($p=0,013$) и на 3-е сутки на 3,38 пг/мл ($p=0,028$).

3. Особенности механизмов экзогенной церебропротекции нейротрофическим препаратом при моделировании локальной ишемии головного мозга

Терапия инсульта препаратом церебролизин, нейротрофического лекарственного препарата на основе гидролизата мозга свиньи также приводила к тенденции к уменьшению летальности подопытных животных,

которая составила 23% ($p=0,029$) (таб.3) и уменьшению объема поражения мозга крыс подопытных животных.

Таблица 3. Влияние препарата церебролизин на летальность подопытных крыс с поражением головного мозга ишемического генеза различной степени тяжести

Группа (n)	Летальность		
	Кол-во павших особей	Процент от исходного объема выборки в группе	95% ДИ
Локальная ишемия (36)	13	36	20,8 – 53,8
Локальная ишемия + ЦЛЗ (40)	9	23	10,8 – 38,5

Терапия лабораторных крыс с локальной ишемией данным препаратом не приводила к существенным изменениям эритроидного ростка кроветворения. Терапия инсульта препаратом церебролизин не приводила к достоверно значимому изменению динамики уровня гематокрита, гемоглобина и общего количества эритроцитов у крыс ($p>0,05$).

Однако, на модели ЛИ+ЦЛЗ наблюдалось достоверное увеличение содержания ретикулоцитов, в остром периоде нарушения церебральной перфузии и периоде отсроченных явлений, а именно на 3-и сут показатель увеличился на 2,26 %/RBC ($p=0,016$) и 7-е сут концентрация ретикулоцитов возросла на 1,64 %/RBC ($p=0,005$) в крови крыс по сравнению с референтными значениями. Таким образом, увеличение содержания ретикулоцитов, начиная с 3-х сут свидетельствует об отсроченной стимуляции красного костного мозга препаратом церебролизин.

С ростом ретикулоцитов в группе ЛИ+ЦЛЗ также выявлялось достоверное повышение среднего объема эритроцитов (MCV) по отношению к контрольной группе на всем протяжении исследования и группе нелеченых животных с моделью локальной ишемии в отсроченный период. По сравнению с группой контроль отмечался рост показателя MCV на 1-е сутки на 2,17 fl ($p=0,049$), на 3-и сутки на 6,03 fl ($p=0,009$) и на 7-е сутки на 7,11 fl ($p=0,006$). По сравнению с группой ЛИ MCV был выше на достоверно принятом уровне значимости на 7-е сутки на 9,93 fl ($p=0,003$).

Увеличение показателя изменения среднего размера эритроцита (эритроцитарный анизоцитоз) в группе ЛИ+ЦЛЗ не фиксировалось на всем протяжении исследования ни по отношению к контрольной группе, ни к группе с моделью локальной ишемии без лечения.

Изменение среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH) в крови подопытных животных в группе ЛИ+ЦЛЗ наблюдалось только в период отсроченных явлений к 7-м сут данный показатель достоверно уменьшался на 3,67 pg ($p=0,046$) по сравнению с контрольной группой.

На фоне применения препарата церебролизин в группе ЛИ+ЦЛЗ динамика содержания тромбоцитов в крови, а также уровень анизоцитоза тромбоцитов (PDW, %) в крови подопытных животных животных не претерпевал достоверно значимых изменений по сравнению с группой

контроль и группой локальная ишемия. Однако отмечалось повышение среднего объема тромбоцитов в крови (MPV) только на 1-е сут на 1,33 fl ($p=0,041$) по сравнению с группой ЛИ. Данный показатель в остальных контрольных точках не имел достоверно значимых отличий от других групп.

Анализ лейкоцитарной формулы крови подопытных животных для группы ЛИ+ЦЛЗ выявил увеличение общего содержания лейкоцитов в крови в острейший период на $6,26 \cdot 10^9/\text{л}$ ($p=0,021$) по отношению к референтным значениям, а также увеличение содержания лимфоцитов к 7-м сут на 4,37 % ($p=0,025$). Существенные отличия были обнаружены в динамике уровня гранулоцитов в крови животных в группе ЛИ+ЦЛЗ по сравнению с контролем, так на 3-и сут наблюдалось снижение данного показателя на 4,25% ($p=0,020$) и на 5,75% ($p=0,011$) к 7-м сут.

При оценке функциональной активности эндотелия кровеносных сосудов при лечении церебролизином на фоне развития локальной ишемии во всех точках исследования достоверных отличий в динамике содержания VEGF не обнаружено.

Препарат церебролизин оказал сочетанное нейропротективное действие на модели локальной ишемии головного мозга крыс, что выражалось в уменьшении содержания нейроспецифических маркеров в острейшем и остром периодах заболевания. На всем протяжении исследования, уровни NSE и белка S100b у животных с инсультом, получавших лечение изучаемым препаратом были сопоставимы с показателями, полученными у интактных животных. Так, показатель NSE в крови в группе ЛИ+ЦЛЗ на 1-е сутки был достоверно ниже на 2,47 мкг/л ($p=0,004$) по сравнению с группой ЛИ и в остальных контрольных точках продолжалась тенденция к его снижению. Аналогичная картина наблюдалась с уровнем показателя белка S100b по сравнению с группой ЛИ, на 1-е сутки он уменьшался на 6,01 пг/мл ($p=0,028$) и на 3-е сутки на 3,78 пг/мл ($p=0,015$).

Выводы

- 1) Моделирование локальной ишемии посредством полной и необратимой перевязки среднемозговой артерии у лабораторных крыс характеризуется преимущественно ишемическим повреждением головного мозга, значительной динамикой лабораторных маркеров нейронов и нейроглии, формированием верифицируемого инфаркта мозга и сравнительно высокой летальностью подопытных животных в сочетании с умеренными изменениями показателей системы крови и системы гемостаза, а также лабораторных маркеров функциональной активности эндотелия.
- 2) Моделирование глобальной ишемии посредством двусторонней перевязки сонных артерий у лабораторных крыс характеризуется преимущественно гипоксическим повреждением головного мозга, умеренными изменениями лабораторных маркеров нейронов и нейроглии, отсутствием верифицируемого инфаркта мозга и низкой летальностью подопытных животных в сочетании со значительной динамикой показателей системы

крови и системы гемостаза, а также лабораторных маркеров функциональной активности эндотелия.

- 3) С учетом выявленных особенностей патогенеза повреждения головного мозга, моделирование локальной ишемии позволяет более точно воспроизвести у лабораторных крыс ишемический мозговой инсульт, а также оценить эффекты антигипоксантных и нейротрофических лекарственных препаратов в рамках защиты головного мозга при острых нарушениях церебральной перфузии.
- 4) Применение антигипоксантного лекарственного препарата на основе янтарной кислоты сопровождалось тенденцией к уменьшению объема инфаркта мозга ($p=0,114$) и тенденцией к снижению летальности подопытных животных ($p=0,19$), оказывало сочетанное нейропротективное действие, характеризовавшееся уменьшением и приближением к референсным значениям плазменных концентрацийNSEна 1-е сут($p=0,003$), белка S100bна 1-е сут ($p=0,013$) и 3-и сут($p=0,028$) после моделирования локальной ишемии у лабораторных крыс. Также было установлено увеличение количества ретикулоцитов на 1-е сут ($p=0,021$), 3-и сут ($p=0,003$) и 7-е сут ($p=0,005$), возрастание доли больших тромбоцитов с одновременным расширением диапазона их распределения на 1-е сут ($p=0,027$), а также стимуляция мобилизации гранулоцитов из маргинированного пула на 1-е сут($p=0,016$) и 3-и сут($p=0,01$), наиболее вероятно, вследствие стимулирующего влияния лекарственного препарата на костный мозг.
- 5) Применение нейротрофического лекарственного препарата на основе гидролизата мозга свиньи также сопровождалось тенденцией к уменьшению объема инфаркта мозга и тенденцией к снижению летальности подопытных животных ($p=0,29$), оказывало сочетанное нейропротективное действие, характеризовавшееся уменьшением и приближением к референсным значениям плазменных концентрацийNSEна 1-е сут($p=0,04$), белка S100bна 1-е сут ($p=0,028$) и 3-и сут($p=0,015$) после моделирования локальной ишемии у лабораторных крыс. Лабораторные признаки влияния лекарственного препарата на функциональную активность костного мозга отсутствовали.
- 6) Применение как антигипоксантного, так и нейротрофического лекарственного препаратов при моделировании локальной ишемии у лабораторных крыс оказывает сочетанное нейропротективное действие, имевшее отсроченный характер для астроцитов. В то же время, особенностью церебропротективного действия антигипоксантного лекарственного препарата на основе янтарной кислоты может являться усиление гемопоэза.
- 7) Результаты экспериментального исследования на лабораторных крысах позволяют обосновать применение антигипоксантного лекарственного препарата на основе янтарной кислоты и нейротрофического лекарственного препарата на основе гидролизата мозга свиньи как в острейшем, так и в остром периодах ишемического мозгового инсульта.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Зелененко М.А., Печатникова В.А., Заплутанов В.А., Цыган Н.В., Верлов Н.А., Хотин М.Г., Васильев А.Г., Трашков А.П. Особенности патогенеза поражения головного мозга при моделировании локального и глобального нарушения церебральной перфузии у лабораторных крыс // Педиатр. – 2017. – Т. 8. № 6. С. 62-71.
2. Зелененко М.А., Трашков А.П., Цыган Н.В., Печатникова В.А., Верлов Н.А., Гаглоева Т.Д. Эндотелиальная дисфункция и возможности ее медикаментозной коррекции при моделировании нарушений церебральной перфузии в эксперименте // Вестник Российско-военно-медицинской академии, №3, 2018, С. 39-40
3. Зелененко М.А., Трашков А.П., Цыган Н.В., Печатникова В.А., Гаглоева Т.Д. Функциональная активность тромбоцитов на моделях локальной и глобальной ишемии головного мозга крыс и возможности её коррекции // Неделя науки, 2018, С. 73-76

Тезисы

1. М.А. Гуменная, А.П. Трашков, Н.В. Цыган, Н.А. Верлов, В.А. Печатникова, М.Р. Артеменко. Особенности патогенеза глобального и локального нарушения церебральной перфузии в эксперименте // Международный конгресс, посвященный Всемирному дню инсульта. Материалы конгресса. Под редакцией Е.И. Гусева, А.Б. Гехт, М.Ю. Мартынова. М.: ООО Буки-Веди, 2017. – С. 497-498.
2. М.А. Гуменная, А.П. Трашков, Н.В. Цыган, Н.А. Верлов, М.Р. Артеменко, В.А. Печатникова. Сравнительный анализ патогенеза локального и глобального нарушения церебральной перфузии (экспериментальное исследование) // Конгресс с международным участием "Давиденковские чтения": сб. тез. - СПб.: Человек и здоровье, 2017. - С. 81-83.
3. Зелененко М.А., Трашков А.П., Цыган Н.В., Печатникова В.А., Верлов Н.А., Гаглоева Т.Д. Эндотелиальная дисфункция и возможности ее медикаментозной коррекции при моделировании нарушений церебральной перфузии в эксперименте // Вестник Российско-военно-медицинской академии, №3, 2018, С. 39-40
4. Зелененко М.А., Трашков А.П., Цыган Н.В., Печатникова В.А., Гаглоева Т.Д. Функциональная активность тромбоцитов на моделях локальной и глобальной ишемии головного мозга крыс и возможности её коррекции // Неделя науки, 2018, С. 73-76
5. M. Zelenenko, N. Tsygan, A. Trashkov, N. Verlov, V. Pechatnikova, V. Zaplutanov. Comparative analysis of pathogenesis of acute alteration of brain perfusion in models of local and global ischemia in laboratory rats // 27 european stroke conference, 11-13 april 2018, Athens, Greece.
6. Зелененко М.А., Трашков А.П., Цыган Н.В., Печатникова В.А., Верлов Н.А., Заплутанов В.А. Особенности патогенеза острого и хронического нарушения

мозгового кровообращения на моделях глобальной и локальной ишемии у лабораторных крыс//

XX Давиденковские чтения сборник тезисов юбилейного конгресса с международным участием хх давиденковские чтения к 125-летию создания первой в россии кафедры усовершенствования врачей-неврологов. Под редакцией профессора С.В. Лобзина. 2018. С. 143-144

Список цитируемой литературы

- 1) Медико-демографические показатели Российской Федерации в 2012 году` 2013: Стат. справочник/Минздрав России. – М., 2013. – С. 180
- 2) Petty G.W., Brown R.D. et al. Ischemic Stroke Subtypes A Population-Based Study of Functional Outcome, Survival, and Recurrence. Stroke. 2000. 31: 1062
- 3) Одинак М.М. и др. Оценка эффективности цитофлавина у больных в остром периоде ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии. – 2010. – № 12. – С. 29-36.
- 4) Цыган В.Н. и соавт. Патофизиология клетки, 2015. - С. 114
- 5) Зенков Н. К., Лапкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М. — Интерпериодика: 2001. — С. 343
- 6) Зозуля Ю. А., Барабой В. А., Сутковой Д. А. Свободно - радикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. — М.: Знание-М, 2000. — С. 344
- 7) Лапкин В. З., Тихадзе А. К., Беленков Ю. Н. Свободно- радикальные процессы в норме и при патологических состояниях. — М., 2001. —С. 78
- 8) С. Зилбернагель, Ф. Ланг. Клиническая патофизиология. - 2016 г. – С. 8 – 12
- 9) М.М. Одинак. Нервные болезни, 2016 г. – С. 286 – 289
- 10) Клинические рекомендации: диагностика и тактика при инсульте в условиях общей врачебной практики. 2013 г. – С. 5 -6.
- 11) Суслина З.А. Антитромботическая терапия ишемических нарушений мозгового кровообращения с позиций доказательной медицины / З.А. Суслина, М.М. Танащян, М.А. Домашенко. — 2-е изд. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009. — С. 224
- 12) Шабалина, А.А. Гемостаз и биохимические маркеры повреждения ткани мозга при атеротромботическом и лакунарном подтипах ишемического инсульта. А.А. Шабалина. — М., 2008. — С. 31
- 13) А.Ш. Орадова. Молекулярные основы развития ишемического инсульта. Вестник КазНМУ, №4(1) – 2013
- 14) Sharma P., Carter M.L., Barley J., Brown M.M. Molecular approach to assessing the genetic risk of cerebral infarction. J Hum Hypertens 1994. 8: 645—648.

- 15) Folsom A.R. Hemostatic risk factors for atherothrombotic disease: an epidemiologic view. *Thromb Haemost* 2001. 86: 366—373
- 16) Hassan A., Hugh S. Markus. Genetics and ischaemic stroke. *Brain* 2000. 123: 1784—1796.
- 17) Tracy R.P. Epidemiological evidence for inflammation in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 1999. 82: 826—831.
- 18) И.А. Гончар, Ю.И. Степанова, И.С. Прудывус. Биохимические предикторы и маркеры инфаркта головного мозга. 2013. с. 106
- 19) Жукова И.А., Алифирова В.М., Жукова Н.Г. Нейронспецифическая енолаза как неспецифический маркер нейродегенеративного процесса. 2011
- 20) Hatfield R., McKernan R. CSF neuron-specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in a rat stroke model. *Brain. Res.* 1992. V. 577. P. 249—252.
- 21) Rabinowicz A.J., Correale J., Boutros R.B. et al. Neuronspecific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring. *Epilepsia.* 1996. V. 37. P. 122—125
- 22) Лапина Е.Ю. Клинико-функциональные аспекты симптоматической эпилепсии. Новосибирск, 2007. С. 22
- 23) Martens P., Raabe A., Johnsson P. *Stroke* 1998; 29: 2363-2366.
- 24) D'Aversa, T. Myelin basic protein induces inflammatory mediators from primary human endothelial cells and blood-brain barrier disruption: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis / T. D'Aversa, E. Eugenin, L. Lopez, J. Berman // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 39. – P. 270–283.
- 25) Скоромец А.А., Пугачева Е.Л. Исследование эффективности комплексного препарата цитофлавин для коррекции последствий легкой черепно-мозговой травмы // *Журнал неврологии и психиатрии.* – 2010. – № 3. – С. 31-36.
- 26) Румянцева С.А. и др. Энергокоррекция цитофлавином в остром периоде инсульта // *Вестник интенсивной терапии.* – 2005. – № 2. – С. 23-26.
- 27) Бохан Н.А. и др. Применение цитофлавина в терапии абстинентного синдрома у больных алкоголизмом: Пособие для врачей. СПб - Томск, 2006. – 32 с.
- 28) Voelkel, N.F. Vascular endothelial growth factor in the lung / N.F. Voelkel, R.W. Vandivier, R.M. Tuder // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2006. — Vol.290, №2. — P. 209-221.
- 29) Ferrara, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor / N. Ferrara // *J. Mol. Med.* — 1999. — Vol.77. — P. 527-543.
- 30) Beck H., Plate K.H. Angiogenesis after cerebral ischemia// *Acta. Neuropathol.* — 2009.- Vol.117, №5.- P.481-496.Ciulla, T.A. Antivascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration / T.A. Ciulla, P.J. Rosenfeld // *Curr Opin Ophthalmol.* — 2009. — Vol. 20 (3). — P. 158165.

- 31) Serum VEGF levels in acute ischaemic strokes are correlated with longterm prognosis / S.C. Lee [et al.] // Eur. J. Neurol. — 2010. — Vol. 17, №1. — P. 45-51.
- 32) Dougherty, J.H. Platelet activation in acute cerebral ischaemia. Serial measurements of platelet function in cerebrovascular disease / J.H. Dougherty, D.E. Levy, B.B. Weksler // Lancet. — 1977. — Vol.1. — P.821-824. 25
- 33) Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct / K. H. Plate [et al.] // J. Neuropathol. Exp. Neurol. — 1999. — Vol. 58, №6. — P. 654-666.
- 34) Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia / T. Hayashi [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2003. — Vol. 23. — P. 166-180.
- 35) В.В. Фатеева, О.В. Воробьева Маркеры эндотелиальной дисфункции при хронической ишемии мозга // Журнал неврологии и психиатрии – 2017. – № 4. – С. 107-111.
- 36) Hill N.C., Millikan C.H., Wakim K.G., Sayre G.P. Studies in cerebrovascular disease, VII: experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot: preliminary report. // Mayo Clin. Proc. – 1955. – V.30. – P. 625-633.
- 37) Goyal M et al. Challenges and opportunities of endovascular stroke therapy. Ann Neurol. 2016;79(1):11-7
- 38) Ziganshina LE, Abakumova T, Vernay L. Cerebrolysin for acute ischaemic stroke. Cochrane Database of Systematic Reviews,2017