

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ЭРИТРОПОЭТИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

М.В. Осиков¹, Р.У. Гиниатуллин², А.Н. Кузьмин³, Е.В. Маркелова⁴

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск, Россия,

²Многопрофильный центр лазерной медицины, г. Челябинск, Россия,

³Областная клиническая больница № 3, г. Челябинск, Россия,

⁴Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия

Цель работы – исследовать влияние эритропоэтина на неврологический статус, микроциркуляцию и морфологию очага повреждения при экспериментальной ишемии головного мозга (ЭИКГМ). **Материалы и методы исследования.** Исследование выполнено на 70 нелинейных крысах. ЭИКГМ моделировали диатермокоагуляцией пиальных сосудов в проекции сагиттального шва между лобно-теменным и теменно-затылочным швами. Через 3, 24 и 48 ч вводили эритропоэтин в дозе 5000 МЕ/кг. Неврологический статус животных оценивали по шкале J.H. Garcia. Микроциркуляцию в тканях коры головного мозга определяли с помощью лазерной доплеровской флуориметрии. В очаге ишемического повреждения на срезах головного мозга подсчитывали на условной единице площади количество неизмененных нейронов, нейронов с хроматолизом и клеток-теней, количество мелких кровеносных сосудов. **Результаты.** Установлено, что при ЭИКГМ у крыс на 1–3–7–14–30 сутки наблюдения снижается интегральный показатель неврологического статуса, оцениваемый по шкале J.H. Garcia, на 7–14–30 сутки снижается показатель микроциркуляции, количество интактных нейронов; увеличивается количество нейронов с хроматолизом и клеток-теней в очаге повреждения головного мозга. **Заключение.** Применение при ЭИКГМ эритропоэтина в суммарной дозе 15000 МЕ/кг приводит на 3–7 сутки наблюдения к частичному, а на 14–30 сутки – к полному восстановлению неврологического статуса у животных, восстановлению на 7–14–30 сутки микроциркуляции, увеличению количества интактных нейронов, мелких кровеносных сосудов, уменьшению представительства нейронов с хроматолизом и клеток-теней в очаге ишемии.

Ключевые слова: церебральная ишемия, эритропоэтин, неврологический статус, морфология.

Введение. Эритропоэтин (ЭПО), прежде всего, известен как фактор, стимулирующий образование эритроцитов de novo, благодаря пионерской работе P. Carnot et al., опубликованной в 1906 г., в которой блестяще продемонстрировано, что плазма крови экспериментальных животных после кровопотери содержит фактор, вызывающий ретикулоцитоз у интактных животных [5]. После выделения чистого ЭПО, идентификации его структуры, клонирования гена для клинического использования было налажено промышленное производство рекомбинантного человеческого ЭПО, который можно отнести к одним из самых успешных препаратов за весь период использования технологий рекомбинантной ДНК [15]. ЭПО имеет молекулярную массу

30,4 кДа, его молекула состоит из 165 аминокислот и 4 углеводных цепей, необходимых для стабилизации структуры, защиты от дегградации свободными радикалами, температурой, реализации биологической активности [23]. Важное значение имеют 2 дисульфидные связи между остатками цистеина в положениях 7 и 160, 29 и 33. Период полураспада ЭПО после поступления в кровь составляет 5–6 ч. В основном ЭПО синтезируется перитубулярными и тубулярными клетками почек, где в ответ на гипоксию экспрессируется ген ЭПО при участии гипоксия-индуцируемого фактора-1 [10]. ЭПО также может синтезироваться нейронами, клетками микроглии, гепатоцитами, клетками Купфера, клетками эндометрия, эндотелиальными клетками, кардио-

миоцитами, инсулин-продуцирующими клетками [8]. Внепочечный ЭПО является низко-салирированным с более коротким периодом полужизни, а его эффект, прежде всего, проявляется на ауто- и паракринном уровнях [2].

Результаты оценки эффектов ЭПО на молекулярном уровне позволяют отнести его одновременно к гормонам, факторам роста и цитокинам. Основной мишенью для ЭПО являются бурст- и колониеобразующие единицы гранулоцитарно-моноцитарно-мегакариоцитарно-эритроцитарные, эритроцитарные, а также эритробласты и проэритробласты, в которых он отвечает за пролиферацию, дифференцировку, угнетение апоптоза [6]. Открытие рецепторов для ЭПО на клетках незэритроидных тканей, таких как нейроны, кардиомиоциты, клетки почек, эндотелиоциты, лимфоциты, моноциты, макрофаги и др., позволило обнаружить новые незэритроидные эффекты ЭПО, сам ЭПО стал рассматриваться в роли плеiotропного регулятора гомеостаза и как звено неспецифической защиты при повреждении, а рецепторы ЭПО на незэритроидных клетках обозначаются как защищающие ткань рецепторы (TPR) [1]. Строение TPR отличается от рецептора ЭПО на эритроидных клетках, для его активации требуются меньшие концентрации ЭПО [13]. TPR состоит из субъединиц рецептора ЭПО и β CR (общий рецептор β , CD131), последний также представлен в составе рецепторов для ГМ-КСФ, ИЛ-3, ИЛ-5.

В последние годы внимание многих исследователей сосредоточено на плеiotропных эффектах ЭПО [12]. В частности, продемонстрировано влияние ЭПО на тонус и репарацию сосудов, кардиомиоцитов, нефроэпителиоцитов, активацию эндотелиоцитов, сократительную способность миокарда, тромбоцитопоз, лейкопоз, систему гемостаза, иммунный статус и др. [7, 28, 29, 30]. Особого внимания заслуживают нейротропные эффекты ЭПО [3, 16, 18]. В головном мозге у плода обнаружены ЭПО и его рецептор, а их дефицит приводит к нарушению эмбриогенеза мозга, активации апоптоза нейронов. Увеличение концентрации ЭПО в амниотической жидкости при гипоксии плода оказывает нейропротекторный эффект, снижает повреждение клеток сетчатки. Применение ЭПО в эксперименте восстанавливает когнитивную функцию и препятствует атрофии мозга при сотрясении мозга, аутоиммунном энцефаломиелите. Ранее нами показано позитивное влияние ЭПО на аффектив-

ный и психофизиологический статус, состояние вегетативной нервной системы у больных ХПН, находящихся на гемодиализе [27].

Ишемический инсульт является самым распространенным (80 % случаев) видом инсульта и возникает в результате критического снижения мозгового кровотока – менее 8 мл / 100 г / мин. Снижение мозгового кровотока до 20 мл / 100 г / мин приводит к дисфункции нейронов при сохранной жизнеспособности – это область пенумбры (полутени), где деполяризация и гибель клеток наступает примерно через 80 мин. Дальнейшее снижение мозгового кровотока до 18 мл / 100 г / мин запускает метаболический каскад, ведущий к повышению уровня эксайтотоксичных нейротрансмиттеров, нарушению функции ионных насосов, синтезу свободных радикалов и простагландинов, внутриклеточному накоплению Ca^{2+} и гибели клеток уже через 40 мин. При полном отсутствии церебрального кровотока разрушение клеток коры больших полушарий наступает примерно через 4 мин. Таким образом, в результате ишемического инсульта формируется центральное, необратимо пораженное ядро инфаркта и потенциально обратимая зона ишемической полутени, которая является мишенью для терапии. Помимо максимально раннего восстановления мозгового кровотока, которое достигается различными реперфузионными методами, патогенетически обоснованным методом терапевтического воздействия при ишемическом инсульте является предотвращение разрушения мембран нейронов в области пенумбры и обеспечение адекватной доставки O_2 в ишемизированную ткань. В этом отношении неподдельный интерес вызывает ЭПО.

Цель работы – исследовать влияние ЭПО на неврологический статус, микроциркуляцию и морфологию очага повреждения при экспериментальной ишемии головного мозга.

Материал и методы исследования. Работа выполнена на 70 беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 220–250 г. Животные находились в стандартных условиях вивария на типовом рационе 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, с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используе-

мых в научных целях от 22.09.2010 г. Оперативные вмешательства проводились в экспериментальной операционной с соблюдением правил асептики и антисептики под внутримышечным обезболиванием препаратом «Золетил-100» (Virbac «Sante Animale», Франция) в дозе 2 мг/кг массы. Все животные были случайным образом разделены на три группы: группа 1 (n = 10) – ложноперированные животные, у которых проводили трепанацию черепа и вскрытие твердой мозговой оболочки без диатермокоагуляции пиальных сосудов (ложноперированные животные); группа 2 (n = 30) – модель ишемии коры головного мозга (ИКГМ) создавали путем диатермокоагуляции пиальных сосудов коры головного мозга в сенсомоторной зоне; группа 3 (n = 30) – животные, у которых на фоне ИКГМ применяли ЭПО. ЭПО («Эпокрин», ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург) вводили внутривенно через 3, 24 и 48 ч от индукции ИКГМ в разовой дозе 5000 МЕ/кг, суммарная доза 15000 МЕ/кг. Второй группе животных вводили эквивалентное количество физиологического раствора. Выведение животных из эксперимента осуществлялось путем внутрисердечного введения 3 мл 7,5 % раствора хлористого калия (ООО «Фармлэнд» Республика Беларусь).

Неврологический статус у крыс исследовали с использованием шкалы J.H. Garcia и оценкой следующих параметров: спонтанная активность в клетке за 5 мин; симметричность вытягивания передних конечностей; симметричность движений; способность забираться по стенке проволочной клетки; реакция на прикосновение к каждой стороне туловища; ответ на прикосновение к вибриссам. Максимальный неврологический дефицит – 3 балла, его полное отсутствие – 18 баллов. Для оценки микроциркуляции применялся прибор «ЛАКК-01» (Россия) на основе инфракрасного лазера с трехканальным световым зондом, смонтированным из кварцевых моноволоконных световодов. Показатели снимались в течение 5 мин через трепанационное отверстие с помощью датчика, приложенного к месту операции. Математическая и статистическая обработка показателей прибора осуществлялась с помощью комплекта программ ООО «Лазма» (Россия) и расчетом показателя микроциркуляции (ПМ), который является функцией от усредненной скорости эритроцитов (V_{cp}) и концентрации эритроцитов в зонди-

руемом объеме тканей ($N_{эр}$), зависящей от показателя гематокрита и количества функционирующих сосудов: $ПМ = N_{эр} + V_{cp}$. Величина ПМ измерялась в относительных перфузионных единицах (пф. ед.). После выведения животных из эксперимента извлекался головной мозг, производилась его макроскопическая оценка, фрагменты окрашивались гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии по методу Бильшовского – для выявления миелиновых волокон, по методу Ниссля – для верификации тигроидного вещества Ниссля. Микропрепараты исследовали на микроскопе «Leica DMRXA» (Германия) с помощью компьютерной программы анализа цветового изображения «ДиаМорф Сито-W» (Россия) при увеличении микроскопа $\times 400$, в 10 случайно отобранных полях зрения на условной единице площади оценивали: количество неизменённых нейронов; количество нейронов с хроматолизом; количество клеточных тел; количество мелких кровеносных сосудов (капилляров, артериол). Оценку неврологического статуса проводили на 1, 3, 7, 14, 30 сутки, микроциркуляцию и морфологию очага повреждения – на 7, 14 и 30 сутки после индукции ИКГМ. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics 19. Показатели обрабатывались методами описательной статистики и представлены в виде медианы (Me) и квартилей [Q_1 – Q_3]. Значимость различий между группами оценивали при помощи непараметрического критерия Крускал–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). Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости 0,01.

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что при экспериментальной ИКГМ уже на 1 сутки наблюдения изменяется неврологический статус, интегральный показатель по шкале J.H. Garcia снижался в среднем в 3, 4 раза (табл. 1). Угнетение неврологических функций выражалось в развитии различной степени двигательного дефицита на стороне, контрлатеральной очагу по-

ражения, гиподинамии, заторможенности животных, статокординаторных расстройств. Аналогичные изменения зафиксированы на 3 и 7 сутки экспериментальной ИКГМ. В последующие сроки наблюдения – на 14 и 30 сутки – наблюдалась тенденция к частичному восстановлению неврологической симптоматики. Однако интегральный показатель неврологического статуса по шкале J.H. Garcia статистически значимо отличался от группы ложнооперированных животных во все сроки наблюдения вплоть до 30 суток после индукции ИКГМ. При оценке микроциркуляции в очаге повреждения коры больших полушарий головного мозга выявлено значимое снижение показателя микроциркуляции на 7, 14, 30 сутки после индукции ИКГМ в среднем соответственно на 48, 50, 28 % (табл. 2). При этом не обнаружено значимых отличий показателя микроциркуляции в динамике эксперимента. Изменения неврологического статуса и микроциркуляции нашли отражение в результатах морфологической оценки очага повреждения головного мозга у крыс после ИКГМ (табл. 3). Так, в динамике наблюдения с 7 по 30 сутки эксперимента прогрессивно снижается количество интактных нейронов, увеличивается количество нейронов с хроматолизом, клеточных теней. На этом фоне наблюдается тенденция к увеличению количества мелких кровеносных сосудов в очаге повреждения с 7 до 30 суток после индукции ИКГМ, что является отражением активации неангиогенеза в комплексе компенсаторных реакций при ишемии головного мозга.

Зафиксированные нарушения неврологического статуса, снижение микроциркуляции, количество интактных нейронов и увеличение количества поврежденных и погибших клеток в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ являются отражением ограничения кровотока, ишемии сенсомоторной зоны коры больших полушарий головного мозга и гипоксического некролиза нейронов. Известно, что формирование инфаркта происходит в течение 28–72 ч с момента инсульта, а возможно и дольше с учетом влияний сохраняющегося отека мозга и других отдаленных последствий ишемии. Патогенез церебральной ишемии включает угнетение аэробного и анаэробного гликолиза, снижение синтеза АТФ, нарушение активного транспорта ионов через мембрану с раскрытием агонист-зависимых Ca^{2+} -каналов и увеличением концентрации

свободного цитозольного кальция в нейроне, что приводит к дисфункции эксайтотоксических медиаторов возбуждения. Особое значение при снижении мозгового кровотока и развитии фокальной ишемии придается глутамат-кальциевому каскаду: индукции (запуск), амплификации (усиление повреждающего потенциала) и экспрессии (конечные реакции каскада, непосредственно приводящие к гибели клетки). На первом этапе в результате выброса большого количества глутамата в синаптическую щель в ответ на ишемию и связывание глутамата с инотропными рецепторами N-метил-D-аспартата, метаболотропными и АМРА-рецепторами открываются кальциевые каналы, возникает массивное вхождение внутрь нейронов ионов Ca^{2+} , Ca^{2+} -индуцированная эксайтотоксичность. В нейронах снижается содержание калия, увеличивается концентрация натрия, что сопровождается гипергидратацией и отеком, нарушением механизмов синаптической передачи. В результате электролитного дисбаланса изменяются электрические свойства нейронов, развивается аноксическая деполяризация мембран, которая считается главным критерием необратимого поражения клеток.

Применение ЭПО при экспериментальной ИКГМ приводит на 1, 3, 7 сутки наблюдения к частичному восстановлению, а на 14 и 30 сутки – к полному восстановлению неврологического статуса у крыс, оцениваемого по шкале J.H. Garcia (табл. 1). На 14 и 30 сутки эксперимента не обнаружено статистически значимых отличий между группой ложнооперированных крыс и крыс с ИКГМ, которым вводили ЭПО. Показатель микроциркуляции в очаге ишемического повреждения коры больших полушарий головного мозга после применения ЭПО увеличивался на 7, 14 и 30 сутки наблюдения по сравнению с группой крыс без применения ЭПО и статистически значимо не отличался от группы ложнооперированных крыс (табл. 2). Нейропротекторный эффект и улучшение кровоснабжения очага ишемии при ИКГМ после применения ЭПО подтверждается данными морфологического исследования мозга. Уже на 7 сутки эксперимента в очаге ишемического повреждения по сравнению с группой животных без введения ЭПО снижается количество нейронов с хроматолизом, клеточных теней, увеличивается количество интактных нейронов и мелких кровеносных сосудов (табл. 3). Аналогичные изменения кле-

точного состава и представительства кровеносных сосудов наблюдаются на 14 и 30 сутки наблюдения.

Полагаем, что нейропротекторный эффект ЭПО при экспериментальной ИКГМ обусловлен, прежде всего, прямым влиянием на нейроны и глиоциты, а также активацией неоангиогенеза в очаге ишемического повреждения. Показано, что экспрессия мРНК ЭПО и рецептора ЭПО вдвойне усиливается при гипоксических воздействиях [18]. Внутриклеточная

точная трансдукция сигнала после связывания ЭПО с EPOR обеспечивается Jak-2-зависимыми сигнальными путями: трансдукторы сигналов и активаторы транскрипции (STAT-5, STAT-3), фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), протеинкиназа В (PKB), гликоген-синтаза киназа-3β (GSK-3β), митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK) и др. [4, 9, 14, 17, 25]. Так, STAT-5 приводит к активации антиапоптозных генов и генов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку клеток.

Таблица 1
Table 1

Влияние ЭПО на интегральный показатель неврологического статуса по шкале J.H. Garcia при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1–Q3])
Effects of EPO on the integral indicator of the neurological status estimated by Garcia scale at ECI (Me [Q1–Q3])

Группы животных Groups of animals	1 сутки Day 1 (n = 6)	3 сутки Day 3 (n = 6)	7 сутки Day 7 (n = 6)	14 сутки Day 14 (n = 6)	30 сутки Day 30 (n = 6)
1. Ложно-оперированные 1. Sham operated	17 [17,00–18,00]	18 [17,00–18,00]	18 [18,00–18,00]	18 [18,00–18,00]	18 [18,00–18,00]
2. ИКГМ 2. ECI	5 [4,00–5,25]	6 [5,00–7,25]	9 [8,00–10,5]	12 [11,0–13,0]	15 [14,0–16,25]
3. ИКГМ + ЭПО 3. ECI + EPO	6,5 [6,00–7,00]	10 [9,50–11]	13,5 [12–15]	15 [13,75–16,25]	17 [15,75–18,0]
Различия по критерию Фридмана Friedman test differences	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
Различия по критерию Манна–Уитни Mann–Whitney test differences	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 ₁₋₃ < 0,001 P ₂₋₃ < 0,001	P ₁₋₂ < 0,001 P ₁₋₃ = 0,05 P ₂₋₃ < 0,001	P ₁₋₂ = 0,003 P ₁₋₃ = 0,06 P ₂₋₃ < 0,001

Таблица 2
Table 2

Влияние ЭПО на показатель микроциркуляции в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ (Ме [Q1–Q3])
Effects of EPO on microcirculation in the ischemic focus at ECI (Me [Q1–Q3])

Группа Group	7 сутки Day 7 (n = 6)	14 сутки Day 14 (n = 6)	30 сутки Day 30 (n = 6)
1. Ложно-оперированные 1. Sham operated	5,29 [4,87–6,95]	5,19 [4,57–6,95]	5,21 [4,53–6,95]
2. ИКГМ 2. ECI	2,75 [0,89–3,87]	2,57 [1,36–5,48]	3,77 [2,93–4,38]
3. ИКГМ + ЭПО 3. ECI + EPO	6,34 [4,93–7,60]	5,33 [4,02–7,05]	5,78 [3,38–6,78]
Различия по критерию Крускалла–Уолиса Kruskal–Wallis test differences	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,006
Различия по критерию Манна–Уитни Mann–Whitney test differences	P ₁₋₂ = 0,001 P ₁₋₃ = 0,364 P ₂₋₃ = 0,001	P ₁₋₂ = 0,001 P ₁₋₃ = 0,940 P ₂₋₃ = 0,01	P ₁₋₂ = 0,001 P ₁₋₃ = 0,880 P ₂₋₃ = 0,004

Влияние ЭПО на морфометрические показатели в очаге повреждения при экспериментальной ИКГМ (количество клеток / у.е. площади, Ме [Q1–Q3])
Effects of EPO on morphometric indicators in the ischemic focus at ECI (cell count / area unit, Me [Q1–Q3])

Показатели Indicators	Группы / Groups					
	Группа 2. Ишемия ГМ (ИГМ) Group 2. Cerebral ischemia (CI)			Группа 3. ИГМ+ ЭПО Group 3. CI + EPO		
	7 сутки Day 7 (n = 6)	14 сутки Day 14 (n = 6)	30 сутки Day 30 (n = 6)	7 сутки Day 7 (n = 6)	14 сутки Day 14 (n = 6)	30 сутки Day 30 (n = 6)
Неизмененные нейроны Unmodified neurons	36,50 [30,87–42,77]	30,38 [23,08–36,39]	25,21 [15,96–32,29]#	83,4 [79,30–87,86]*	89,94 [87,64–91,65]*	91,26 [84,71–98,25]*
Нейроны с хроматолизом Chromatolytic neurons	25,94 [25,21–26,73]	34,10 [32,03–35,09]#	42,10 [40,45–43,10]#	9,24 [8,96–10,65]*	7,08 [6,78–7,73]*	6,10 [5,99–6,18]*
Клетки-тени Shadow cells	62,25 [58,08–66,84]	70,75 [67,04–72,68]#	76,35 [70,77–78,01]#	10,28 [9,29–11,65]*	6,76 [6,15–7,64]*	3,30 [2,71–3,95]*
Мелкие кровеносные сосуды Small blood vessels	7,13 [6,41–7,87]	8,84 [7,73–10,14]	14,26 [11,93–16,01]	16,27 [15,62–17,04]*	19,41 [18,52–20,42]*	25,63 [23,76–27,60]*

Примечание. * – статистически значимые ($p < 0,01$) различия с группой 2 на соответствующие сутки, # – с группой 2 на 7 сутки по критерию Крускала–Уолиса и критерию Манна–Уитни.

Note. * – statistically significant ($p < 0.01$) differences with group 2 on the respective day, # – with group 2 on day 7 according to Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney test.

PI3K, PKB и MAPK подавляют активность GSK-3 β , что приводит к стабилизации мембраны митохондрий (сохранение $\Delta\psi$ митохондриальной мембраны), снижению выхода цитохрома с Araf-1-зависимой активации каспаз. Кроме того, снижение активности GSK-3 β угнетает NF κ B-зависимый синтез провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 β , ИЛ6, TNF- α , MCP-1 и др. С другой стороны, PKB опосредует синтез eNOS в эндотелиальных и др. клетках. В экспериментальных условиях *in vitro* ЭПО напрямую вызывает деление стволовых клеток головного мозга и их дальнейшую дифференцировку. Кроме этого, ЭПО регулирует созревание и дифференцировку олигодендроглии и пролиферацию астроцитов, оказывает антиапоптотический эффект на клетки микроглии [22]. ЭПО препятствует апоптозу нейронов в условиях гистотоксической или циркуляторной гипоксии [11]. При введении ЭПО в желудочки мозга у грызунов ингибировался апоптоз, вызванный ишемией, и предотвращалось развитие неврологической симптоматики. ЭПО, проникая через гематоэнцефалический барьер,

напрямую стимулирует функцию нейронов, улучшает их жизнеспособность через активацию кальциевых каналов и высвобождение нейромедиаторов, является антагонистом глутамата, регулирует продукцию нейромедиаторов, увеличивает активность антиоксидантных ферментов, тормозит NO-зависимые свободнорадикальные процессы [19]. ЭПО дозозависимым образом стимулирует неоангиогенез, действуя на рецепторы в церебральных сосудах [26]. Установлено, что в эндотелиоцитах в условиях гипоксии комплекс рецептора ЭПО и β CR соединяется с рецептором для VEGF (VEGFR $_2$). Такое взаимодействие необходимо для ЭПО-опосредованной продукции NO эндотелиоцитами [20, 21].

Выводы

1. При экспериментальной ишемии сенсорной зоны коры головного мозга, индуцированной диатермокоагуляцией пиальных сосудов у крыс на 1–3–7–14–30 сутки наблюдения снижается интегральный показатель неврологического статуса, оцениваемый по шкале J.H. Garcia, на 7–14–30 сутки снижается показатель микроциркуляции, снижается

количество интактных нейронов, увеличивается количество нейронов с хроматолизом и клеток-теней в очаге повреждения головного мозга.

2. Применение при экспериментальной ишемии коры головного мозга эритропоэтина в суммарной дозе 15000 МЕ/кг приводит на 3–7 сутки наблюдения к частичному, а на 14–30 сутки – к полному восстановлению неврологического статуса у животных, восстановлению на 7–14–30 сутки микроциркуляции, увеличению количества интактных нейронов, мелких кровеносных сосудов, уменьшению представительства нейронов с хроматолизом и клеток-теней в очаге ишемии.

Литература / References

1. Brines M., Cerami A. Erythropoietin-Mediated Tissue Protection: Reducing Collateral Damage From the Primary Injury Response. *J. Intern. Med.*, 2008, vol. 264, pp. 405–432. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2008.02024.x
2. Brines M., Cerami A. The Receptor that Tames the Innate Immune Response. *Mol. Med.*, 2012, vol. 18, pp. 486–496. DOI: 10.2119/molmed.2011.00414
3. Brines M.L., Ghezzi P., Keenan S. Erythropoietin Crosses the Blood-Brain Barrier to Protect Against Experimental Brain Injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 19, pp. 10526–10531. DOI: 10.1073/pnas.97.19.10526
4. Broxmeyer H.E. Erythropoietin: Multiple Targets, Actions, and Modifying Influences for Biological and Clinical Consideration. *J. Exp. Med.*, 2013, vol. 210, no. 2, pp. 205–208. DOI: 10.1084/jem.20122760.
5. Carnot P., DeFlandre C. Sur l'activite Hemopoietique de Serum au Cours de la Regeneration du Sang. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1906, vol. 143, pp. 384–386.
6. D'Andrea A.D., Zon L.I. Erythropoietin Receptor. Subunit Structure and Activation. *J. Clin. Invest.*, 1990, vol. 86, no. 3, pp. 681–687.
7. Desai A., Lewis E., Solomon S. Impact of Erythropoiesis-Stimulating Agents on Morbidity and Mortality in Patients with Heart Failure: an Updated, Post-TREAT Meta-Analysis. *Eur. J. Heart Fail.*, 2010, vol. 12, pp. 936–942. DOI: 10.1093/eurjhf/hfq094
8. Fenjves E.S., Ochoa M.S., Cabrera O. Human, Nonhuman Primate, and Rat Pancreatic Islets Express Erythropoietin Receptors. *Transplantation*, 2003, vol. 75, pp. 1356–1360. DOI: 10.1097/01.TP.0000062862.88375.BD
9. Hand C.C., Brines M. Promises and Pitfalls in Erythropoietin-Mediated Tissue Protection: Are Nonerythropoietic Derivatives a Way Forward? *J. Investig. Med.*, 2011, vol. 59, no. 7, pp. 1073–1082. DOI: 10.2310/JIM.0b013e3181ed30bf.
10. Ikeda E. Cellular Response to Tissue Hypoxia and Its Involvement in Disease Progression. *Pathol. Int.*, 2005, vol. 55, pp. 603–610. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2005.01877.x
11. Kim M.S., Seo Y.K., Park H.J. The Neuroprotective Effect of Recombinant Human Erythropoietin via an Antiapoptotic Mechanism on Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Korean J. Pediatr.*, 2010, vol. 53, no. 10, pp. 898–908. DOI: 10.3345/kjp.2010.53.10.898
12. Kowalczyk M., Banach M., Mikhailidis D.P. Erythropoietin Update 2011. *Med. Sci. Monit.*, 2011, vol. 17, no. 11, pp. 240–247. DOI: 10.12659/MSM.882037
13. Leist M., Ghezzi P., Grasso G. Derivatives of Erythropoietin that are Tissue Protective but not Erythropoietic. *Science*, 2004, vol. 305(5681), pp. 239–242. DOI: 10.1126/science.1098313
14. Li J., Luo Y., Li Z. Effects of Erythropoietin Pretreatment on Pro-and Anti-Inflammatory Balance in Rats with Severe Acute Pancreatitis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.*, 2012, vol. 32, no. 1, pp. 93–96.
15. Lin F.K., Suggs S., Lin C.H. Cloning and Expression of the Human Erythropoietin Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, vol. 82, pp. 7580–7584. DOI: 10.1073/pnas.82.22.7580
16. Loeliger M.M., Mackintosh A., de Matteo R. Erythropoietin Protects the Developing Retina in an Ovine Model of Endotoxin-Induced Retinal Injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, vol. 52, pp. 2656–2661. DOI: 10.1167/iovs.10-6455
17. Maiese K., Chong Z.Z., Shang Y.C. Erythropoietin: New Directions for the Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, vol. 13, no. 9, pp. 11102–11129. DOI: 10.3390/ijms130911102
18. McPherson R.J., Juul S.E. Erythropoietin for Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2010, vol. 22, no. 2, pp. 139–145. DOI: 10.1097/MOP.0b013e328336eb57
19. Milano M., Collomp R. Erythropoietin and Neuroprotection: a Therapeutic Perspective. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, 2005, vol. 11, no. 4, pp. 145–149. DOI: 10.1191/1078155205jp162oa
20. Sautina L., Sautin Y., Beem E. Induction of Nitric Oxide by Erythropoietin is Mediated by the β Common Receptor and Requires Interaction with VEGF Receptor 2. *Blood*, 2010, vol. 115, pp. 896–905. DOI: 10.1182/blood-2009-04-216432

21. Su K.H., Shyue S.K., Kou Y.R. β Common Receptor Integrates the Erythropoietin Signaling in Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J. Cell Physiol.*, 2011, vol. 226, pp. 3330–3339. DOI: 10.1002/jcp.22678
22. Sugawa M., Sakurai Y., Ishikawa-Ieda Y. Effects of Erythropoietin on Glial Cell Development; Oligodendrocyte Maturation and Astrocyte Proliferation. *Neurosci. Res.*, 2002, vol. 44, no. 4, pp. 391–403. DOI: 10.1016/S0168-0102(02)00161-X
23. Toyoda T., Itai T., Arakawa T. Stabilization of Human Recombinant Erythropoietin Through Interactions with the Highly Branched N-glycans. *J. Biochem (Tokyo)*, 2000, vol. 128, pp. 731–737. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022809
24. Trincavelli M.L., Da Pozzo E., Ciampi O. Regulation of Erythropoietin Receptor Activity in Endothelial Cells by Different Erythropoietin (EPO) Derivatives: An in Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 2, pp. 2258–2281. DOI: 10.3390/ijms14022258
25. Wang G., Huang H., Wu H. Erythropoietin Attenuates Cardiopulmonary Bypass-Induced Renal Inflammatory Injury by Inhibiting Nuclear Factor- κ B p65 Expression. *Eur. J. Pharmacol.*, 2012, vol. 689, no. 1–3, pp. 154–159. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.05.027
26. Yamaji R., Okada T., Moriya M. Brain Capillary Endothelial Cells Express Two Forms of Erythropoietin Receptor mRNA. *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 239, no. 2, pp. 494–500. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0494u.x
27. Осиков М.В., Ахматов К.В., Кривожижина Л.В. Патофизиологический анализ влияния эритропоэтина на психологический статус у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе. *Человек. Спорт. Медицина*. 2010. № 19 (195). С. 110–116. [Osikov M.V., Akhmatov K.V., Krivokhizhina L.V. [Pathophysiological Analysis of the Effect of Erythropoietin on Psychological Status in Patients With Chronic Renal Failure Who are on Hemodialysis]. *Chelovek. Sport. Meditsina* [Human. Sport. Medicine], 2010, no. 19 (195), pp. 110–116. (in Russ.)]
28. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Агеев Ю.И. Антиоксидантный эффект эритропоэтина при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Бюл. эксперимент. биологии и медицины*. 2015. Т. 160, № 8. С. 162–165. [Osikov M.V., Telesheva L.F., Ageev Yu.I. [Antioxidant Effect of Erythropoietin in Experimental Chronic Renal Failure]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2015, vol. 160, no. 8, pp. 162–165. (in Russ.)]
29. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Агеев Ю.И. Влияние эритропоэтина на апоптоз лимфоцитов при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Бюл. эксперимент. биологии и медицины*. – 2015. – № 3. – С. 326–329. [Osikov M.V., Telesheva L.F., Ageev Yu.I. [Influence of Erythropoietin on Apoptosis of Lymphocytes in Experimental Chronic Renal Failure]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2015, no. 3, pp. 326–329. (in Russ.)]
30. Осиков, М.В. Влияние эритропоэтина на процессы свободно-радикального окисления и экспрессию гликопротеинов в тромбоцитах при хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков // *Бюл. эксперимент. биологии и медицины*. – 2014. – Т. 157, № 1. – С. 30–33. [Osikov M.V. [Effect of Erythropoietin on the Processes of Free Radical Oxidation and Expression of Glycoproteins in Platelets in Chronic Renal Failure]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2014, vol. 157, no. 1, pp. 30–33. (in Russ.) DOI: 10.1007/s10517-014-2483-3]

Осиков Михаил Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии, Южно-Уральский государственный медицинский университет. 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, д. 64. E-mail: prof.osikov@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-4395-3798.

Гиниатуллин Равиль Усманович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научно-исследовательской работе, Многопрофильный центр лазерной медицины. 454026, г. Челябинск, пр. Победы, д. 287. ORCID: 0000-0001-7645-0575.

Кузьмин Андрей Николаевич, заведующий отделением нейрохирургии № 1, Областная клиническая больница № 3. 454026, г. Челябинск, пр. Победы, д. 287. ORCID: 0000-0003-4251-9153.

Маркелова Елена Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии, Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690002, г. Владивосток, проспект Острякова, д. 2. ORCID: 0000-0001-5846-851X.

Поступила в редакцию 15 сентября 2017 г.

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF ERYTHROPOETIN IN EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

M.V. Osikov¹, prof.osikov@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-4395-3798,

R.U. Giniatullin², ORCID: 0000-0001-7645-0575,

A.N. Kuzmin³, ORCID: 0000-0003-4251-9153,

E.V. Markelova⁴, ORCID: 0000-0001-5846-851X

¹South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation,

²Multidisciplinary center for laser medicine, Chelyabinsk, Russian Federation,

³Regional clinical hospital № 3, Chelyabinsk, Russian Federation,

⁴Vladivostok State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok, Russian Federation

The presence of receptors for erythropoietin (EPO) on neurons and endothelial cells, its involvement in the embryogenesis of the nervous tissue suggests the EPO neuroprotective effect in the ischemic damage of the brain. **The aim** of the study was to investigate the EPO effect on the neurological status, microcirculation and morphology of the lesion focus in experimental cerebral ischemia (ECI). **Materials and Methods.** The study was performed on 70 nonlinear rats. ECI was modeled by the diathermocoagulation of the pial vessels in the sagittal suture projection between the fronto-parietal and parieto-occipital sutures. EPO was used at a dose of 5000 IU/kg with the interval of 3, 24 and 48 hours. The Garcia scale was used to assess the animals' neurological status. Microcirculation in the cerebral cortex tissues was determined by laser Doppler fluorimetry. The number of unmodified neurons, neurons with chromatolysis and shadow cells, and the number of small blood vessels were counted on the area unit in the brain sections in the ischemic damage focus. **Results.** In rats with ECI, the integral index of neurological status estimated by the Garcia scale decreases on days 1–3–7–14–30; the microcirculation index and the number of intact neurons decrease; the number of neurons with chromatolysis and shadow cells increases in the focus of the cerebral cortex lesion on days 7–14–30. The use of EPO in the total dose of 15.000 IU/kg results in partial recovery in 3–7 days, complete recovery of the neurological status in animals in 14–30 days, microcirculation restoration, growth of the number of intact neurons and small blood vessels, and decrease of neurons with chromatolysis and shadow cells in the ischemic focus in 7–14–30 days.

Keywords: cerebral ischemia, erythropoietin, neurological status, morphology.

Received 15 September 2017

ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Нейропротекторный эффект эритропоэтина при экспериментальной ишемии головного мозга / М.В. Осиков, Р.У. Гиниатуллин, А.Н. Кузьмин, Е.В. Маркелова // Человек. Спорт. Медицина. – 2017. – Т. 17, № 4. – С. 41–49. DOI: 10.14529/hsm170405

FOR CITATION

Osikov M.V., Giniatullin R.U., Kuzmin A.N., Markelova E.V. Neuroprotective Effect of Erythropoietin in Experimental Cerebral Ischemia. *Human. Sport. Medicine*, 2017, vol. 17, no. 4, pp. 41–49. (in Russ.) DOI: 10.14529/hsm170405