

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ИШЕМИИ СПИННОГО МОЗГА У КРЫС ПРИ ОККЛЮЗИИ БРЮШНОЙ АОРТЫ НИЖЕ ПОЧЕЧНЫХ АРТЕРИЙ

*Г. В. Пономарев¹, А. А. Шмонин^{1,2} К. Т. Алиев¹, Т. Д. Власов^{1,2},
Е. В. Мельникова¹, Д. Г. Смолко¹, А. А. Скоромец¹*

¹ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Пономарев Григорий Вячеславович — клинический ординатор кафедры неврологии и нейрохирургии с клиникой ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова); *Шмонин Алексей Андреевич* — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры неврологии и нейрохирургии с клиникой ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова; *Алиев Камалудин Тажудинович* — кандидат медицинских наук, докторант кафедры неврологии и нейрохирургии с клиникой ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова; *Власов Тимур Дмитриевич* — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова; *Мельникова Елена Валентиновна* — доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии с клиникой ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова; *Смолко Дмитрий Геннадьевич* — кандидат медицинских наук, докторант кафедры неврологии и нейрохирургии с клиникой ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова; *Скоромец Александр Анисимович* — академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой неврологии и нейрохирургии с клиникой ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

Контактная информация: ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова», ул. Льва Толстого, 6–8, к. 10, Санкт-Петербург, 197022. Тел.: +7(812)234–16–25. E-mail: langendorff@gmail.com (Шмонин Алексей Андреевич).

Резюме

Актуальность. Спинальный инсульт сопровождается грубыми, стойкими неврологическими и соматическими расстройствами. Моделирование ишемии позволяет изучить патофизиологические процессы в спинном мозге и улучшить результаты лечения. **Цель исследования** — разработка методики ишемии спинного мозга за счет окклюзии инфраренального сегмента брюшной аорты у крыс. **Материалы и методы.** В серии опытов на крысах Wistar проводили перевязку брюшной аорты ниже почечных артерий, наблюдали за неврологическим дефицитом через 48 часов, затем осуществляли гистологическое исследование срезов пояснично-крестцового отдела спинного мозга животных для выявления ишемических изменений в нейронах. **Результаты.** В цитоархитектонике спинного мозга опытных животных выявлено преобладание гиперхромных сморщенных и несморщенных нейронов и клеток-теней, а также глиальная реакция. Данные изменения указывают на необратимую, коагуляционную стадию ишемии спинного мозга. **Выводы:** 1) окклюзия брюшной аорты ниже почечных артерий у крыс Wistar приводит к ишемическому поражению пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга. Таким образом, окклюзия аорты ниже почечных артерий у крыс Wistar может быть рассмотрена как адекватная модель ишемического спинального инсульта у крыс; 2) таким образом можно моделировать спинальную ишемию с диффузным поражением нейронов пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга.

Ключевые слова: спинной мозг, ишемия, модель, нейроны.

EXPERIMENTAL MODEL OF SPINAL CORD ISCHEMIA IN RATS BY OCCLUSION OF ABDOMINAL AORTIC BELOW RENAL ARTERIES

G. V. Ponomarev¹, A. A. Shmonin^{1,2}, K. T. Aliev¹, T. D. Vlasov^{1,2},
E. V. Melnikova¹, D. G. Smolko¹, A. A. Skoromets¹

¹ I. P. Pavlov First Federal Medical University, St-Petersburg, Russia

² Federal Almazov Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding Author: I. P. Pavlov First Federal Medical University, 6–8 L. Tolstoy str., building 10, St-Petersburg, Russia, 197022. Tel.: +7(812)234–16–25. E-mail: langendorff@gmail.com (Alexey A. Shmonin, PhD, Assistant at the Department of Neurology and Neurosurgery).

Abstract

Background. Spinal stroke is accompanied by rude, persistent neurological and physical disorders. Modeling of ischemia allows to explore the pathophysiological processes in the spinal cord and improve treatment outcomes. **Objective.** To develop a model of spinal cord ischemia in rats by aortic occlusion below renal arteries. **Methods.** We performed ligation of the abdominal aorta below the renal arteries in Wistar rats and watched the neurological deficit after 48 hours. Then we carried out histological examination of sections of the lumbosacral spinal cord to detect ischemic changes in neurons. **Results.** We revealed the predominance of hyperchromatic neurons and shadow-cells in spinal cord of experimental animals. Glial reaction is also revealed. These changes indicates an irreversible, coagulation stage of spinal cord ischemia. **Conclusions.** 1) Occlusion of the aorta below the renal arteries in Wistar rats leads to ischemic lesions on the lumbar level of spinal cord. Thus, the occlusion of the aorta below the renal arteries of Wistar rats may be viewed as a model of spinal ischemic stroke in rats. 2) This model allows to model incomplete spinal ischemia with diffuse disease of neurons of the lumbosacral spinal cord.

Key words: spinal cord, ischemia, model, neurons.

Статья поступила в редакцию 15.06.14 и принята к печати 04.08.14.

Введение

Ишемические поражения спинного мозга встречаются реже, чем головного мозга. Соотношение частоты возникновения сосудистых заболеваний головного и спинного мозга составляет 4:1 [1]. С позиции социально-экономической значимости спинальный инсульт прогностически не менее опасен по сравнению с церебральным, т. к. приводит к развитию глубоких парезов и плегий конечностей, к частым осложнениям в виде нарушений трофики тканей (пролежни), расстройств функции сфинктеров тазовых органов и присоединением восходящей уроинфекции, что определяет высокий процент инвалидизации таких больных, а также их низкий лечебный и социальный реабилитационный потенциал.

Второй по частоте причиной развития ишемии спинного мозга выступает патология аорты [2]. К острым и хроническим миелоишемиям приводят как врожденные нарушения снабжающих спинной мозг сосудов (коарктация аорты, сосудистые мальформации в виде артериальных и артериовенозных аневризм, телеангиоэктазии, ангиоматоз), так и приобретенных поражений аорты (ее атеросклероз и расслаивающая аневризма, васкулиты

и др.). Актуальной причиной развития острых радикуломиелоишемий в настоящее время является позвоночно-спинномозговая травма и оперативное вмешательство на грудной и брюшной аорте с необходимостью ее пережатия [3, 4]. По данным литературы частота возникновения нижней параплегии при таких операциях варьирует от 2 до 40% [2, 5].

В этом контексте важной проблемой является предотвращение гибели и восстановление функции ишемизированных нейронов спинного мозга. Для решения таких задач необходимо воссоздать в эксперименте ишемию спинного мозга и исследовать действие лечебных факторов (медикаментозных и других). Это потребовало разработки адекватной экспериментальной модели миелоишемии. В литературе описаны несколько интервенционных и фотохимических моделей получения миелоишемии [5, 6], однако эти модели оказываются технически трудновоспроизводимыми и дорогостоящими, что затрудняет их серийное их воспроизводство.

Следует отметить, что из литературы известно о первых моделях пережатия брюшной аорты с развитием паралича задних конечностей. Это опыты Стенона на морских свинках (1667) и Шиффера на кроликах (1869) [7]. При гистологическом исследовании

довании была доказана роль ишемии спинного мозга в развитии двигательных расстройств в задних конечностях экспериментальных животных (собак, кошек, кроликов, морских свинок, крыс, мышей) [8]. Такая модель оказывается сравнительно простой в воспроизводстве и позволяет получать яркую клиническую картину ишемического поражения спинного мозга, а также контролировать эффективность лечебно-реабилитационных мероприятий.

Материалы и методы

Эксперименты проводили в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85–23, США) и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей редакцией Р. У. Хабриева (2005). Опыты выполнены на 12 крысах-самцах линии Wistar массой 200–250 г. Все оперативные вмешательства проведены в экспериментальной операционной с соблюдением правил асептики и антисептики под общей анестезией хлоралгидратом (450 мг/кг), введенным внутривенно.

Экспериментальные животные были поделены на две экспериментальные группы. К первой (контрольной) отнесены ложноперирированные крысы, которым производили выделение брюшного отдела аорты без ее окклюзии ($n = 6$); у второй (опытной) проводили пережатие инфраренального отдела брюшной аорты без реперфузии ($n = 6$).

Для моделирования ишемии пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга у анестезированных животных выполняли лапаротомию, выделяли инфраренальный отдел брюшной аорты, которую перевязывали шовной шелковой нитью. Операционная рана ушивалась. Животные помещались по одному в клетку. Неврологический дефицит оценивали через 48 часов по шкале Тарлова (табл. 1).

Таблица 1

ОЦЕНКА ФУНКЦИИ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПО ШКАЛЕ ТАРЛОВА

Баллы	Критерий оценки
0	отсутствие движений в задних конечностях
1	единичные движения в суставах
2	активные движения в конечностях
3	сохранена способность сидеть, невозможность прыжков
4	слабость в задних конечностях
5	полное восстановление движений

Спустя 48 часов после перевязки брюшной аорты медицинской иглой пунктировали левый желудочек сердца и вводили 4-процентный раствор параформальдегида на фосфатном буфере с целью фиксации спинного мозга. Затем послойно препарировали мягкие ткани поясничного отдела и выделяли позвоночник. После ламинэтомии и пересечения спинномозговых корешков извлекали из позвоночного канала спинной мозг. Затем его заливали парафином (или целлулоидином) и после застывания проводили на микротоме срезы пояснично-крестцовых сегментов (L_2-S_4) толщиной 5 мкм и окрашивали тионином по методике Ниссля. Далее под световым микроскопом при увеличении $\times 100$, $\times 400$ подсчитывали число нейронов нормохромных, гиперхромных сморщенных и несморщенных и гипохромных, клеток-теней.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0». Для сравнения двух независимых выборок был использован непараметрический тест Манна-Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

При оценке неврологического статуса через 48 часов после операции с перевязкой брюшной аорты у всех крыс был выявлен грубый задний парализ, у одной крысы была задняя параплегия с нарушением функции тазовых органов (задержка мочи и кала). У ложноперирированных крыс неврологического дефицита не наблюдали. Разница между группами была значимой — $p = 0,0095$. Результаты неврологического статуса у крыс основной и контрольной групп оценивали по шкале Тарлова, что представлено на рис. 1.

Гистологическое исследование срезов спинного мозга (L_2-S_4) контрольной и основной групп показало, что в группе животных с ишемией спинного мозга наблюдается статистически достоверно большее количество гиперхромных сморщенных ($p = 0,0095$), несморщенных клеток ($p = 0,0095$) и клеток-теней ($p = 0,00952$). Наиболее выраженные морфологические изменения отмечены в передних рогах спинного мозга, определялся выраженный периваскулярный и перицеллюлярный отек (рис. 2). На фоне диффузного поражения нейронов выявлялись зоны с более выраженной их ишемией, однако некроза ткани спинного мозга не было.

В группе ложноперирированных животных наблюдались преимущественно нормохромные и гипохромные клетки — $p = 0,0095$ и $p = 0,019$ соответственно.

Рисунок 1. Результаты оценки неврологического дефицита у экспериментальных крыс по шкале Тарлова

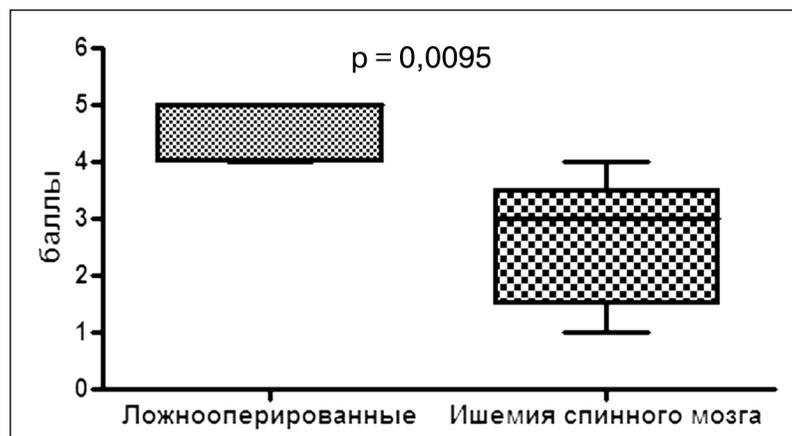
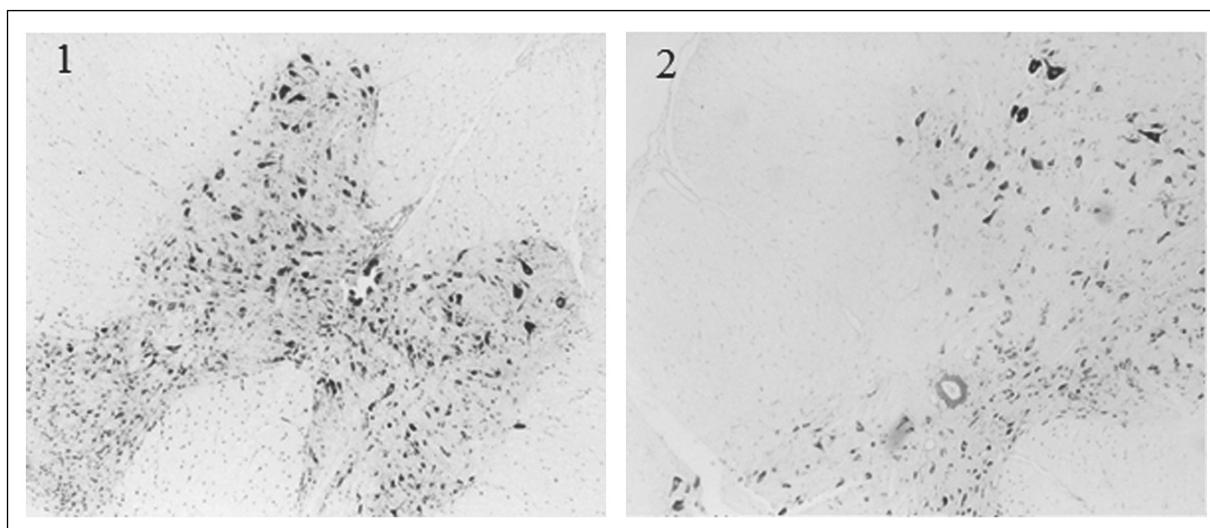


Рисунок 2. Нейроны переднего рога сегмента L₄-L₅ крысы (спустя 48 часов после перевязки брюшной аорты) (1) по сравнению с контролем (2). Окраска по Нислю. Увеличение x100



Обсуждение

Известно, что на начальной стадии повреждающее действие ишемии носит потенциально обратимый денатурационный характер, проявляющийся, как правило, хроматолизом, а на поздней стадии — коагуляционными изменениями нейронов с различной степенью выраженности гиперхромии [9, 10]. Среди гиперхромных нейронов выделяют ряд переходных форм: от реактивно измененных нейронов с легкой степенью гиперхромии до totally гиперхромных, сморщенных клеток. Встречались нейроны с тяжелым повреждением с переходом их в клетки-тени [11].

В нашей экспериментальной модели ишемии спинного мозга отмечалось появление относительно небольшого количества гипохромных и преобладание гиперхромных нейронов в соотношении с грубым неврологическим дефицитом,

что свидетельствует о поздней, необратимой стадии ишемического повреждения — стадии коагуляционных изменений (рис. 3). Также на низкую активность нейронов указывает глиальная реакция в виде появления сателлитных глиоцитов (рис. 4). Вариабельность неврологического дефицита среди крыс опытной группы объясняется относительной компенсацией за счет усиления коллатерального кровообращения из соседних сосудистых бассейнов сегментных ветвей грудной аорты и перимедуллярных артерий.

Каждый из существующих сегодня вариантов создания ишемии спинного мозга преследует свои определенные задачи: это может быть изучение самого механизма ишемии, процессов происходящих в области поражения и интактных зонах мозга, а также в иннервируемых органах и системах. Тем не менее основная цель любой из техник — опреде-

Рисунок 3. Результаты подсчета числа нейронов переднего рога поясничного сегмента спинного мозга крысы (в основной и контрольной группах)

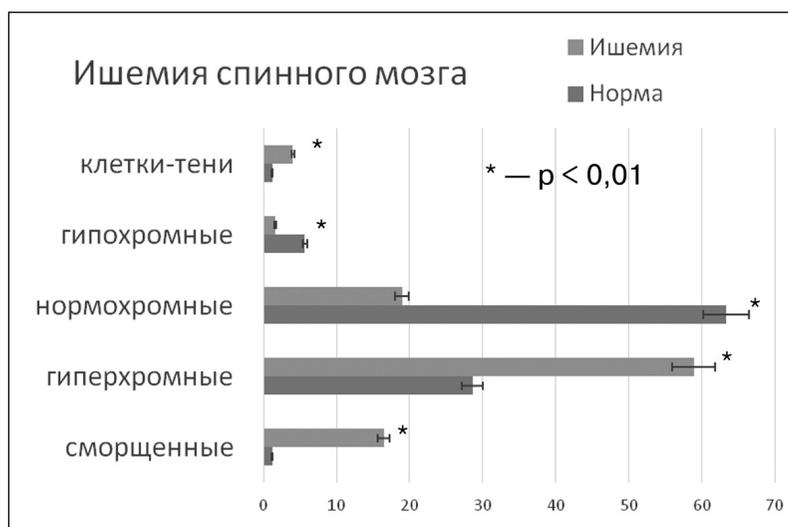
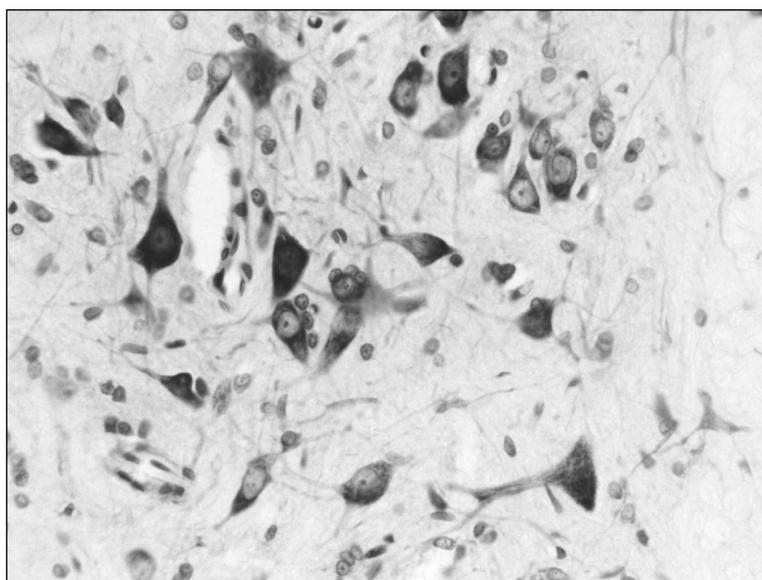


Рисунок 4. Постишемическая цитоархитектоника переднего рога поясничного сегмента спинного мозга крысы (основной группы), глиальная реакция. Окраска по Нисслю. Увеличение $\times 400$



ление условий, необходимых для восстановления функций ЦНС.

Так, существует метод клипирования аорты на 45 минут с последующей реперфузией [2, 4, 12], используемый для исследования различных биохимических процессов в веществе спинного мозга, например, выявления тканевого ингибитора металлопротеиназ [3]. При транзиторной миелоишемии обнаруживают морфологические изменения интернейронов в III–VII пластинах по Рекседу и менее выраженные изменения в пластине II [13]. Однако данная модель не позволяет получить достоверную клиническую и морфометрическую картину ишемии спинного мозга. Проведенное нами экспериментальное пережатие брюшной аорты

с реперфузией проявлялось легким парализмом задних конечностей и разной по степени ишемизации нейронов передних рогов спинного мозга.

Перспективным современным способом ишемии спинного мозга является метод интравазальной баллонной окклюзии катетером типа Fogarty [5, 11, 14, 15], помещаемым в брюшном отделе аорты доступом через бедренную артерию. Данный метод представляет собой модель чистой экспериментальной миелоишемии, но является технически наиболее сложным. Модель экспериментальной миелоишемии можно также воспроизвести с помощью холестериновых эмболов при введении холестериновой суспензии в аорту. Кристаллы холестерина способны облитерировать просвет

передней и задних спинальных артерий. Такая модель миелоишемии не требует наркоза и нанесения травм животному [8].

Фототромботическая модель основана на фотохимической реакции между светочувствительным красителем и пучком света, посредством которой вырабатывается синглетный кислород, обладающий токсическим эффектом на ткани, в том числе и сосуды. Повреждение происходит в результате окклюзии микрососудов спинного мозга [6].

К сожалению, как уже было сказано, большинство из перечисленных методик являются дорогостоящими и технически трудновоспроизводимыми, что препятствует серийному проведению эксперимента для проверки состоятельности модели.

Проведенная нами окклюзия аорты ниже почечных артерий у крыс Wistar приводит к ишемическому поражению пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга. Данная модель является наиболее практичной и подходящей для решения задач по влиянию лекарственных препаратов вазоактивного и нейроцитопротекторного действия, а также для определения исследуемых биомаркеров ишемии пояснично-крестцового отдела спинного мозга.

Выводы

Окклюзия брюшной аорты ниже почечных артерий у крыс Wistar приводит к ишемическому поражению пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга. Таким способом можно моделировать спинальную ишемию с диффузным поражением нейронов пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга.

Окклюзия аорты ниже почечных артерий у крыс Wistar может быть рассмотрена как адекватная модель ишемического спинального инсульта у крыс.

Литература

1. Неврология: национальное руководство / под ред. Е. И. Гусева, А. Н. Коновалова, В. И. Скворцовой, А. Б. Гехт. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — С. 1040.
2. Akgun S., Tekeli A., Kurtkaya O. et al. Neuroprotective effects of FK-506, L-carnitine and azathioprine on spinalcord ischemia-reperfusion injury // *European Journal of Cardiothoracic Surgery*. — 2004. — Vol 25. — P. 105–110.
3. Anik I., Kokturk S., Genc H. et al. Immunohistochemical analysis of TIMP-2 and collagen types I and IV in experimental spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats // *The Journal of Spinal Cord Medicine*. — 2011. — Vol. 34, № 3. — P. 257–264.
4. Korkmaz K., Gedik H. S., Budak A. B. et al. Effect of heparin on neuroprotection against spinal cord ischemia and reperfusion in rats // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* — 2013. — Vol. 17. — P. 522–530.
5. Park S. M., Cho S. J., Ryu S. M. et al. The Effect of Distal Aortic Pressure on Spinal Cord

Perfusion in Rats // *Korean J. Thorac. Cardiovasc Surg.* — 2012. — Vol. 45. — P. 73–79.

6. Jang J. W., Lee J. K., Kim S. H. Activation of Matrix Metalloproteinases-9 after Photothrombotic Spinal Cord Injury Model in Rats // *J. Korean Neurosurg. Soc.* — 2011. — Vol. 50. — P. 288–292.

7. Скоромец А. А., Скоромец А. П., Скоромец Т. А. и др. Спинальная ангионеврология. — М.: МЕДпресс-информ, 2003. — С. 608.

8. Щаницын И. Н., Иванов А. Н., Бажанов С. П. и др. Методы изучения изменений в спинном мозге при травматических повреждениях периферического нерва // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. — 2014. — Т. 13, № 1(49). — С. 13–22.

9. Benton R. L., Maddie M., Dincman T. et al. Transcriptional activation of endothelial cells by TGF β coincides with acute microvascular plasticity following focal spinal cord ischaemia/reperfusion injury // *ASN Neuro*. — 2009. — Vol. 1, № 3. — P. 181–194.

10. Li X. Q., Wang J., Fang B. et al. Intrathecal antagonism of microglial TLR4 reduces inflammatory damage to blood-spinal cord barrier following ischemia/reperfusion injury in rats // *Molecular brain*. — 2014. — Vol. 7, № 28.

11. Гиниатуллин П. У., Володченко А. М., Козель А. И. и др. Патоморфологические и функциональные изменения в ишемизированном спинном мозге крыс после применения рекомбинантного эритропоэтина // *Вестник ЮУрГУ. Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура»*. — 2013. — Т. 13, № 4. — С. 100–103.

12. Hasturk A., Atalay B., Calisaneller T. Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia/reperfusion injury and correlation with tissue damage // *Turkish Neurosurgery*. — 2009. Vol. 19, № 4. — P. 353–359.

13. Щурова Е. Н., Худяев А. Т., Митина Ю. Л., Люлин С. В. Оценка возможностей высокочастотной ультразвуковой доплерографии при интраоперационном мониторинге кровотока травмированного спинного мозга // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. — 2007. — Т. 6, № 3(23). — С. 70–77.

14. Umehara S., Goyagi T., Nishikawa T. et al. Esmolol and landiolol, selective b1-adrenoreceptor antagonists, provide neuroprotection against spinal cord ischemia and reperfusion in rats // *International Anesthesia Research Society*. — 2010. — Vol. 110, № 4. — P. 1133–1137.

15. Zvara D. A., Zboyovski J. M., Deal D. D. et al. Spinal Cord Blood Flow after Ischemic Preconditioning in a Rat Model of Spinal Cord Ischemia // *The Scientific World JOURNAL*. — 2004. — Vol. 4. — P. 892–898.