

ДИНАМИКА ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ИШЕМИЗИРОВАННОМ СПИННОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ ЭРИТРОПОЭТИНОМ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

А.М. Володченко¹, Р.У. Гиниатуллин², А.И. Козель², Л.В. Астахова²

¹Областная клиническая больница № 3, г. Челябинск,

²Челябинский государственный институт лазерной хирургии, г. Челябинск

Цель. Исследование динамики морфологических изменений в очаге ишемии спинного мозга у крыс под воздействием рекомбинантного эритропоэтина (РЭП). **Материалы и методы.** Работа выполнена на 40 половозрелых крысах. Животные были разделены на две серии эксперимента по 20 животных. Первая серия животных – группа сравнения с моделью ишемии спинного мозга. Во второй серии животным через 3, 24 и 48 ч после ишемии вводили внутривенно 1000 МЕ РЭП. После выведения животных из эксперимента, спинной мозг извлекался с последующим гистологическим и морфометрическим исследованием. Полученные результаты обрабатывали с применением методов вариационной статистики. Статистическая значимость различий сравниваемых признаков в группах проводилась с помощью непараметрического U-теста Манна–Уитни. Различия считались статически значимыми при уровне $p < 0,05$, что соответствует 95 % вероятности безошибочного прогноза. **Результаты.** Исследование препаратов спинного мозга показали, что при использовании РЭП содержание нормальных нейронов и кровеносных сосудов было достоверно больше, а число нейронов с хроматолизом, клеток-теней – меньше на всех сроках экспериментов. **Заключение.** Воздействие РЭП увеличивает на ранних сроках опытов толерантность нейронов к ишемическому повреждению, усиливает пролиферацию глиоцитов и эндотелиоцитов с развитием нового сосудистого русла.

Ключевые слова: спинной мозг; экспериментальная ишемия; патоморфологические и функциональные нарушения; рекомбинантный эритропоэтин.

Введение. Сосудистые заболевания спинного мозга встречаются намного чаще, чем об этом было принято думать. По современным статистическим данным соотношение частоты сосудистых заболеваний головного и спинного мозга равно 4:1.

Спинальный инсульт – это нарушение спинального кровообращения с повреждением спинного мозга и расстройством его функций вследствие затруднения или прекращения поступления крови.

В результате повреждающего действия ишемии происходят необратимые изменения нейронов – формируется очаговый некроз, образуется зона инфарктного ядра [4]. В течение нескольких часов центральный «точечный» инфаркт окружен ишемизированной, но живой тканью – так называемой зоной «ишемической полутени», или пенумбры [2]. В области пенумбры, в целом, сохранен энергетический метаболизм и присутствуют лишь

функциональные, но не структурные изменения [9]. Это область «критической», или «нищей» перфузии, где нейрональная функция снижена, потому что не обеспечиваются метаболические запросы ткани, но клетки остаются жизнеспособными с сохраненным ионным гомеостазом. Именно при своевременном и правильном медикаментозном воздействии на зону пенумбры удается сохранить нейроны от разрушения.

Поэтому в настоящее время большое количество исследований направлено на поиск новых методов лечения спинального инсульта. В связи с этим, в последние годы большой интерес вызывает рекомбинантный эритропоэтин (РЭП) – препарат с доказанной протективной активностью в ответ на ишемию в различных органах и тканях, включая головной [8] и спинной мозг [5]. Показано, что РЭП обладает антиапоптотическим и антигипоксическим действием, стимулирует ангио- и ней-

рогенез [3, 7, 8, 10], а плейотропные эффекты РЭП реализуются за счёт наличия специфических рецепторов на различных клетках, в том числе на нейронах [6].

Материалы и методы исследования.

Нами проведён эксперимент на 40 беспородных половозрелых крысах разного пола массой 220–250 г. Все животные были разделены на 2 серии опытов.

1-я серия эксперимента. На 20 животных (группа сравнения) моделировали ишемию спинного мозга по методике, предложенной Г.З. Суфиановой и др. [1]. Транзиторную ишемию поясничного отдела спинного мозга создавали тотальной интравазальной окклюзией брюшной аорты и ее ветвей. С этой целью в обе бедренные артерии по направлению к сердцу вводили окклюдеры (стерильную нить из хромированного кетгута 3.0), глубину введения которых определяли расстоянием от мечевидного отростка до основания хвоста. Через 45 мин окклюдеры извлекали, а бедренные артерии затем клипировали. Животных выводили из опыта на 3, 7, 14, 30-е сут после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 5 крыс.

2-я серия эксперимента. На 20 животных моделировали ишемию спинного мозга по методике, описанной выше (2-я серия эксперимента). Через три часа после операции каждому животному вводили внутривенно 1000 МЕ рекомбинантного эритропоэтина (ЭПОКРИН 2000 МЕ) из расчёта 5000 МЕ на 1 кг массы тела животного. Затем введение препарата повторяли через 24 и 48 ч по 1000 МЕ после создания ишемии. Выведение животных из опыта осуществляли на 3, 7, 14, 30-е сут после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 5 крыс.

После выведения животных из эксперимента готовились гистологические препараты срезов спинного мозга, которые окрашивались гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии, по методу Бильшовского для выявления миелиновых волокон, по методу Ниссля для верификации тигроидного вещества Ниссля. Исследование и фотографирование микропрепаратов проводилось на микроскопе Leica DMRXA (Германия).

Для объективизации параметров морфологических изменений использовали следующие счётные признаки: 1) количество неизменённых (нормальных) нейронов на условной единице площади; 2) количество нейронов с

хроматолизом на условной единице площади; 3) количество клеток-теней на условной единице площади; 4) количество мелких кровеносных сосудов (капилляров, артериол) на условной единице площади.

Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерной программы анализа цветового изображения «ДиаМорф Cito-W» (Россия), при увеличении микроскопа $\times 400$, в 10 случайно отобранных полях зрения.

Полученные результаты обрабатывали на IBM PC с помощью лицензионного пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoftIns, США). Применялись методы вариационной статистики. Статистическая значимость различий сравниваемых признаков в группах оценивалось с использованием непараметрического U-теста Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне $P < 0,05$, что соответствует 95 % вероятности безошибочного прогноза.

Результаты исследования и их обсуждение. При гистологическом исследовании препаратов поясничного утолщения спинного мозга первой серии эксперимента, наиболее выраженные изменения отмечались в передних рогах – хроматолиз цитоплазмы, пикноз ядер, растворение глыбок базофильного вещества Ниссля в нейронах с превращением их в клетки-тени. Встречались также неизменные и гиперхромные нейроны. Отмечалась нейронофагия, перичеселлюлярный и периваскулярный отек в белом веществе. На 7-е сут в центральной зоне ишемического очага определялись деструктивные изменения в нейронах, а в перифокальной зоне отмечались также неповрежденные нейроны. Увеличивалось содержание астроцитов с признаками их гипертрофии, наблюдалась активизация микроглии, появлялись макрофаги. К 14-м и 30-м сут эксперимента морфологические изменения в тканях спинного мозга были сходными с таковыми, описанными на 7-е сут. В то же время в зоне ишемии сформировался глиосоединительнотканый рубец.

Результаты количественного исследования препаратов спинного мозга в первой серии эксперимента показали, что число нормальных нейронов ($24,3 \pm 1,1$) было значительно меньше лишь на 7-е сут, а количество нейронов с хроматолизом существенно увеличивалось, начиная с 7-х сут ($36,4 \pm 0,9$) до конца сроков эксперимента. В свою очередь,

количество клеток-теней также увеличивалось, но достоверно только на 7-е сут ($58,1 \pm 2,5$), а число кровеносных сосудов – на 30-е сут ($10,2 \pm 0,6$) наблюдения (см. таблицу).

При исследовании гистологических препаратов спинного мозга второй серии эксперимента на 3-е и 7-е сут опытов, а также в последующие сроки наблюдения (14-е и 30-е сут) отмечалась хорошая сохранность нейронов, среди которых встречались отдельные гиперхромные клетки и лишь единичные были с признаками набухания и сморщивания. Определялась гиперемия, активная пролиферация эндотелиоцитов капилляров и артериол. Отсутствия глиосоединительных рубцов на всех сроках опытов свидетельствовало о слабо выраженных ишемических повреждениях, без формирования зоны некроза в тканях спинного мозга.

Результаты морфометрического анализа гистологических препаратов спинного мозга второй серии эксперимента показали, что со-

держание нормальных нейронов по сравнению с предыдущим сроком опыта увеличивалось незначительно, за исключением 7-х сут ($81,8 \pm 2,8$), а число нейронов с хроматолизом на 7-е сут ($20,1 \pm 0,8$), 14-е сут ($17,1 \pm 0,5$), 30-е сут ($12,2 \pm 0,3$) существенно уменьшалось. Наряду с этим, число клеток-теней достоверно уменьшалось: $10,1 \pm 0,2$ (7-е сут); $8,3 \pm 0,4$ (14-е сут); $3,8 \pm 0,5$ (30-е сут). Количество мелких кровеносных сосудов было значительно больше на 7-е сут ($11,9 \pm 0,2$) и 30-е сут ($17,3 \pm 0,3$). Кроме того, содержание нормальных нейронов кровеносных сосудов было достоверно больше, а число нейронов с хроматолизом и клеток-теней – меньше на всех сроках наблюдения по сравнению с 1-й серией опыта (см. таблицу).

Таким образом, у всех животных с ишемией спинного мозга, леченных рекомбинантным эритропоэтином, при исследовании гистологических препаратов спинного мозга на 3-и и 7-е сут опыта, а также в последую-

**Динамика количественных изменений исследованных показателей
в ишемизированных тканях спинного мозга крыс различных серий опытов ($M \pm m$)**

**Dynamics of quantitative changes in the examined parameters
in ischemic spinal cord tissues in rats of different experimental series ($M \pm m$)**

Исследованный показатель (на условной единице площади) Examined parameter (per conditional unit area)	Серия опыта Experimental series	Сроки наблюдения (сутки) Observation stages (days)			
		3-и 3 rd	7-е 7 th	14-е 14 th	30-е 30 th
Количество нормальных нейронов Count of normal neurons	1-я 1 st	$30,2 \pm 2,1$	$24,3 \pm 1,1^*$	$27,8 \pm 1,3^*$	$29,9 \pm 2,5$
	2-я 2 nd	$69,3 \pm 3,1^{**}$	$81,1 \pm 2,8^{***}$	$87,7 \pm 2,5^{**}$	$90,8 \pm 3,5^{**}$
Число нейронов с хроматолизом Count of chromatolytic neurons	1-я 1 st	$29,3 \pm 0,6$	$36,4 \pm 0,9^*$	$43,6 \pm 2,1^*$	$53,8 \pm 1,2^*$
	2-я 2 nd	$25,2 \pm 0,4^{**}$	$20,1 \pm 0,8^{***}$	$17,1 \pm 0,5^{***}$	$12,2 \pm 0,3^{***}$
Число клеток-теней Count of ghost cells	1-я 1 st	$36,2 \pm 2,3$	$58,1 \pm 2,5^*$	$63,8 \pm 2,8$	$67,9 \pm 2,2$
	2-я 2 nd	$15,2 \pm 0,3^{**}$	$10,1 \pm 0,2^{***}$	$8,3 \pm 0,4^{***}$	$3,8 \pm 0,5^{***}$
Количество мелких кровеносных сосудов Number of small blood vessels	1-я 1 st	$4,3 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,4$	$8,1 \pm 0,7$	$10,2 \pm 0,6^*$
	2-я 2 nd	$7,9 \pm 0,1^{**}$	$11,9 \pm 0,2^{***}$	$16,8 \pm 0,5^{***}$	$17,3 \pm 0,3^{**}$

Примечание: 1-я серия опыта – модель ишемии спинного мозга (группа сравнения); 2-я серия опыта – модель ишемии спинного мозга, леченная РЭП; * – $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим сроком опыта в каждой серии; ** – $p < 0,05$ по отношению к 1-й серии опыта.

Note: the 1st experimental series is spinal cord ischemia model (control group); the 2nd experimental series is spinal cord ischemia model, treatment with REP; * – $p < 0.05$ in comparison with the previous stage of experiment for each experimental series; ** – $p < 0.05$ in comparison with the 1st experimental series.

шие сроки наблюдения (14-е и 30-е сут) отмечалась хорошая сохранность нейронов, среди которых встречались отдельные гиперхромные клетки и лишь единичные были с признаками набухания и сморщивания. Наряду с этим, число клеток-теней уменьшалось, причем на 7-е сут достоверно, по сравнению с 3-ми сут. Количество кровеносных сосудов значительно увеличивалось на 7-е и 14-е сут опытов. Кроме того, число нейронов с хроматоллизом и клеток-теней было меньше на всех сроках экспериментов по сравнению с животными контрольной группы.

Заключение. На модели ишемии поясничного отдела спинного мозга, вызванной у крыс тотальной интравазальной окклюзией брюшной аорты и ее ветвей, выявлено нейропротекторное и ангиогенное действие рекомбинантного эритропоэтина, проявлявшееся существенным увеличением толерантности нейронов к повреждению увеличением числа мелких кровеносных сосудов в зоне ишемии.

Литература / References

1. Суфианова Г.З., Усов Л.А., Суфианов А.А. и др. Новая малоинвазивная модель ишемии спинного мозга у крыс // Бюл. эксперимент. биологии медицины. 2002. Т. 133, № 1. С. 116–120. [Sufianova G.Z., Usov L.A., Sufianov A.A. (New Minimally Invasive Model of Spinal Cord Ischemia in Rats). *Byulleten' eksperimental'noy biologii meditsiny* (Bulletin of Experimental Biology Medicine), 2002, vol. 133, no. 1, pp. 116–120 (in Russ.). DOI: 10.1023/A:1015181116808]
2. Astrup J., Siesjo B.K., Symon L. Thresholds in Cerebral Ischemia the Ischemic Penumbra. *Stroke*. 1981, vol. 12, pp. 723–725. DOI: 10.1161/01.STR.12.6.723
3. Celik M., Gokmen N., Erbayraktar S. Erythropoietin Prevents Motor Neuron Apoptosis and Neurologic Disability in Experimental Spinal Cord Ischemic Injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, vol. 99, pp. 2258–2263. DOI: 10.1073/pnas.042693799
4. Fisher M., Takano K. *Ballierie's Clinical Neurology, Cerebrovascular Disease*. London, 1995, pp. 279–296.
5. Inagaki S., Kitos S. Peptides in the Peripheral Nervous System. *Progr. Brain Res.* 1986, vol. 66, pp. 269–316. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)64607-5
6. Masuda S., Nagan M., Takahata K. Functional Erythropoietin Receptor of the Cells with Keural Characteristics. Comparison with Receptor Properties of Erythroid Cells. *J. Biol. Chem.* 1993, vol. 268, pp. 11208–11216.
7. Santhanam A.V., Katusic Z.S. Erythropoietin and Cerebral Vascular Protection. Role of Nitric Oxide. *Acta Pharmacol Sin.* 2006, vol. 27, pp. 1389–1394. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2006.00441.x
8. Siren A.L., Fratelli M., Brines M. Erythropoietin Prevent Neuronal Apoptosis After Cerebral Ischemia and Metabolic Stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, vol. 98, pp. 4044–4049. DOI: 10.1073/pnas.051606598
9. Symon L., Branston N.M., Strong A.J. The Concepts of Thresholds of Ischaemia in Relation to Brain Structure and Function. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 1977, vol. 11, pp. 149–154. DOI: 10.1136/jcp.s3-11.1.149
10. Wang L., Zhang Z., Wang Y., Zhang R., Chopp M. Treatment of Stroke with Erythropoietin Enhances Neurogenesis and Angiogenesis and Improves Neurological Function in Rats. *Stroke*. 2004, vol. 35, pp. 1732–1737. DOI: 10.1161/01.STR.0000132196.49028.a4

Володченко Алексей Михайлович, врач-нейрохирург нейрохирургического отделения № 2; Областная клиническая больница № 3, г. Челябинск, volodchenko174@yandex.ru.

Гиниатуллин Равиль Усманович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научно-исследовательской работе, Челябинский государственный институт лазерной хирургии, г. Челябинск, main@cgilh.chel.ru.

Козель Арнольд Израилевич, доктор медицинских наук, профессор, директор, Челябинский государственный институт лазерной хирургии, г. Челябинск, main@cgilh.chel.ru.

Астахова Людмила Витальевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, отдел фундаментальных исследований, Челябинский государственный институт лазерной хирургии, г. Челябинск, bonikva@mail.ru.

Поступила в редакцию 3 декабря 2015 г.

DYNAMICS OF PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN RAT ISCHEMIC SPINAL CORD AFTER TREATMENT WITH RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN (EXPERIMENTAL STUDY)

A.M. Volodchenko¹, volodchenko174@yandex.ru,
R.U. Giniatullin², main@cgilh.chel.ru,
A.I. Kosel², main@cgilh.chel.ru,
L.V. Astakhova², bonikva@mail.ru

¹Regional clinical hospital № 3, Chelyabinsk, Russian Federation,

²Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery, Chelyabinsk, Russian Federation

Aim is to study the dynamics of morphological changes in spinal cord ischemic lesion in rats influenced by recombinant erythropoietin (REP). **Materials and methods.** The study was conducted on 40 mature rats. The animals were divided into two series of experiment 20 animals each. The first series of animals was the group of comparison with spinal cord ischemia model. In the second series the animals were administered intraperitoneally with 1000 international units of REP in 3, 24, and 48 hours. After the animals had been sacrificed, the spinal cord was removed for further histological and morphometric study. The obtained results were processed using analysis of variance. The statistical significance of differences between compared parameters of the groups was assessed with the Mann-Whitney U test. The differences were considered significant at $p < 0.05$ which corresponds to 95 % confidence interval. **Results.** The study of the spinal cord specimen showed that REP administration results in significantly higher levels of normal neurons and blood vessels, and in significantly lower count of chromatolytic neurons and ghost cells at all stages of experiment. **Conclusion.** At the early stages of experiment the REP effects increases ischemic tolerance of neurons, enhances the proliferation rate of gliocytes and endotheliocytes with development of a new blood stream.

Keywords: spinal cord; experimental ischemia; pathomorphological and functional disorders; recombinant erythropoietin.

Received 3 December 2015

ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Динамика патоморфологических изменений в ишемизированном спинном мозге крыс после лечения рекомбинантным эритропоэтином (экспериментальное исследование) / А.М. Володченко, Р.У. Гиниатуллин, А.И. Козель, Л.В. Астахова // Человек. Спорт. Медицина. – 2016. – Т. 1, № 1. – С. 51–55. DOI: 10.14529/hsm160108

FOR CITATION

Volodchenko A.M., Giniatullin R.U., Kosel A.I., Astakhova L.V. Dynamics of Pathomorphological Changes in Rat Ischemic Spinal Cord after Treatment with Recombinant Erythropoietin (Experimental Study). *Human. Sport. Medicine*, 2016, vol. 1, no. 1, pp. 51–55. (in Russ.) DOI: 10.14529/hsm160108