

Морфологические корреляты терапевтических эффектов магнитной стимуляции спинномозговых образований при экспериментальной травматической и ишемической миелопатии

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. На моделях травматической и ишемической миелопатий (21 и 16 крыс) проводился сравнительный анализ динамики клинических и морфологических показателей при лечении методом магнитной стимуляции спинномозговых образований. Выявленный комплекс неврологических нарушений подтвердил валидность выбранных моделей для эксперимента. Установлена связь между тяжестью неврологических расстройств и структурными изменениями не только в тканях спинного мозга, но и в клетках спинномозговых ганглиев и их дендритах. Магнитная стимуляция оказалась эффективным методом лечения ишемических и травматических миелопатий в эксперименте. Степень восстановления функций коррелировала с выраженностью морфологических признаков регенераторно-репаративных процессов. При этом наиболее значимые структурные изменения при лечении методом магнитной стимуляции определялись в спинномозговых ганглиях крыс обеих серий эксперимента. Объем восстановления функций у этих животных был самым значительным.

Ключевые слова: ишемическая миелопатия, травматическая миелопатия, магнитная стимуляция, спинной мозг, спинномозговой ганглий, электронная микроскопия, нейрон, миелиновое волокно.

Введение. Распространенность поражений спинного мозга (СМ) относительно невысока и составляет от 3 до 5% в общей структуре неврологической патологии. В то же время результаты лечения миелопатий остаются крайне неудовлетворительными и характеризуются значительным процентом утраты трудоспособности и смертности [6].

В этой связи изучение механизмов действия различных методов лечения при поражениях СМ приобретает особую значимость. Акцент научных изысканий последних лет этого спектра проблемы сместился в сторону исследований эффектов афферентных терапевтических воздействий на восстановление функций при миелопатиях. В рамках изучения этих методик большое внимание уделяется магнитной стимуляции (МС) структур центральной нервной системы. Приводятся убедительные данные о высокой терапевтической эффективности данной методики, в том числе и для коррекции двигательных расстройств [2, 7, 9].

В то же время механизмы восстановления функций у больных с миелопатиями при их лечении МС до конца не изучены. Это касается и определения роли различных морфологических субстратов, ответственных за это восстановление. Решение данной проблемы также тесно увязано с необходимостью изучения базовых механизмов пластичности структур центральной нервной системы при поражениях СМ. В частности, в настоящее время явно недостаточно

оценено значение деафферентационных процессов в развитии клинических проявлений миелопатий [3, 4, 8, 10].

Цель исследования. Установить морфологические корреляты регресса клинической симптоматики при магнитной стимуляции спинномозговых образований у крыс с моделями экспериментальных ишемических и травматических миелопатий (ИМ и ТМ).

Задачи исследования:

1. Изучить особенности двигательных, чувствительных и вегетативно-трофических нарушений у животных с моделью ИМ и ТМ.
2. Определить динамику клинических показателей у экспериментальных животных при лечении МС спинномозговых образований.
3. Выявить морфологические корреляты регресса неврологической симптоматики.

Материалы и методы. Проведены 2 серии опытов на взрослых крысах породы Vistar обоего пола, весом 180–200 г. В первой серии опытов у 16 животных была воспроизведена модель ИМ, а во второй серии (21 животное) – модель ТМ. 15 здоровых крыс составили контрольную группу.

Моделирование ИМ проводилось по методу А. Tadahiko [11]. Крысам, анестезированным внутрибрюшинно, проводилась высокая ампутация передних конечностей. В результате изменения статики позво-

ночника, из-за перераспределения веса на задние лапы у всех животных через 2–3 месяца сформировался выраженный кифоз с компримированием СМ в грудном отделе.

Во второй серии опытов всем животным наносилась травма в среднегрудном отделе СМ по следующей методике. Анестезированной внутриперитонеально крысе чрескожно проводилось кратковременное сжатие боковых поверхностей Th5–Th6 позвонков корнцангом с силой на рабочих браншах 15 кг.

В дальнейшем животные обеих серий эксперимента были разделены на две подгруппы. Крысам первых подгрупп проводилась МС спинномозговых образований на уровне поражения. Катушка располагалась перпендикулярно к стимулируемой области с направлением тока противоположным направлению хода эфферентных волокон СМ. Процедура осуществлялась с помощью магнитного стимулятора «Mag-2» (Дания), малой круглой катушкой, монофазным импульсом с напряжением на выходе 200–400 В и частотой 1 имп. в 3–5 с. Стимуляция проводилась ежедневно в течение 5–7 мин, общим числом 30 процедур на курс лечения. Во вторых подгруппах МС не проводилась.

Указанное лечение проводилось, начиная с 95 дня у крыс с моделью ИМ и с 75 дня – у животных с моделью ТМ. При этом в начале и конце курса терапии были осуществлены клинические исследования, включавшие изучение реакции животных на болевое раздражение хвоста, определение возможности передвигаться вверх по доске с наклоном 27°. Функции тазовых органов оценивались по оформленности фекальных масс.

По окончании эксперимента (125 день для модели ИМ, 105 день для модели ТМ) животные забивались для проведения гистологических исследований. Взятие материала периферических нервов, спинномозговых ганглиев (СМГ) и СМ производилось по методу Б.С. Дойникова в модификации Г.А. Акимова и В.В. Семенов-Тянь-Шанской [1].

Материал, взятый для изучения с помощью световой микроскопии, фиксировался в 96% спирте и 10% формалине, обезжизнялся в спиртах восходящей концентрации, заливался в целлоидин или парафин с последующей окраской гематоксилин-эозином, а также методами Ниссля, Ван-Гизон, Вейгерта, Кахала – Фаворского, Шпильмейера.

Материал для электронно-микроскопического исследования фиксировали 2,5% глутаральдегидом на 0,1% какодилатном буфере с дофиксацией 1% раствором четырехокси осмия на том же буфере с сахарозой, заливали в аралдит. Предварительную оценку материала проводили на полутонких срезах толщиной 1 мкм, окрашенных толуидиновым синим, по методу Ниссля. Ультратонкие срезы контрастировали азотнокислым свинцом по Рейнольдсу [5] и изучали в электронных микроскопах «УЕ–100СХ» и «Leo-910».

Результаты и их обсуждение. Общее состояние крыс с моделью ИМ в обеих подгруппах (по 8 особей в каждой) оставалось вполне удовлетворительным в течение всего периода наблюдений по всем оцениваемым показателям. Нарушения движений у животных определялись только через 2–3 недели после ампутации передних конечностей. Расстройства моторной функции с течением времени нарастали и к моменту первого осмотра достигали степени выраженного парализа у двух крыс в первой и одной – во второй подгруппах. У остальных животных определялось умеренное снижение силы мышц в задних лапах. Чувствительные нарушения (при болевом раздражении хвоста) отмечались у двух крыс в первой и у четырех – во второй подгруппах. У всех животных выявлялись расстройства дефекации и мочеиспускания, а также трофические изменения ниже очага поражения в виде выпадения волос. Выраженность трофических расстройств находилась в прямой взаимосвязи со степенью моторного и чувствительного дефицита.

Обследование крыс второй серии эксперимента проходило в стандартных условиях с использованием тех же приемов и методов, что и у животных с моделью ИМ.

При проведении клинических наблюдений у крыс второй серии были обнаружены более выраженные клинические проявления по сравнению с животными первой серии. Общее состояние у большинства животных в первой (10 особей) и во второй (11 крыс) подгруппах было вполне удовлетворительным в течение всего периода наблюдений. Вес крыс существенно не отличался от контрольных значений. Вместе с тем у восьми животных (4 – в первой и 4 – во второй подгруппах) к концу первой недели отмечалось отчетливое ухудшение: крысы становились вялыми, малоподвижными, теряли в весе. Ухудшение общего состояния, по-видимому, было связано с развитием у них гнойных осложнений на фоне трофических изменений тканей ниже уровня поражения.

Нарушения движений в задних лапах у крыс с моделью ТМ наступали сразу после нанесения травмы. К моменту первого осмотра у двух животных первой подгруппы и у одного – второй подгруппы наблюдалась «нижняя» параплегия. У остальных животных нарушения моторной функции достигали степени выраженного парализа. У всех крыс определялись чувствительные нарушения при болевом раздражении хвоста, выявлялись расстройства дефекации и мочеиспускания. Трофические изменения в тканях ниже уровня травмы находились в прямой связи с чувствительными и двигательными нарушениями. Они были более выражены у крыс с плегиями и проявлялись отечностью, выпадением волос, поверхностными эрозиями и язвами.

Проводимая у крыс первых подгрупп обеих серий эксперимента МС оказывала значительное влияние на процессы восстановления функций.

Клинически это проявлялось в уменьшении выраженности двигательных расстройств. Зарегистрированные у животных второй серии плегии восстанавливались до степени выраженного пареза. У 60,0% крыс с ТМ явления выраженного парапареза регрессировали до умеренного. У 20,0% крыс первой подгруппы улучшений в двигательной сфере зарегистрировано не было.

Явления выраженного парапареза, определяемые при первом обследовании у 25,0% крыс первой подгруппы с моделью ИМ, регрессировали до умеренного. У остальных животных моторные нарушения стали минимальными и проявлялись только в незначительном ограничении двигательной активности. Снижение степени выраженности гипестезии отмечалось у всех животных первых подгрупп обеих серий эксперимента. Качественная оценка не позволяла выявить степень регресса расстройств функций тазовых органов, вегетативно-трофических нарушений.

Восстановление двигательных функций у животных вторых подгрупп обеих серий было менее значительным. Уменьшение выраженности пареза определялось у 37,5% крыс с моделью ИМ и у 9,1% животных второй серии. В большей степени отмечался регресс чувствительных расстройств, наблюдавшийся у 50,0% крыс с моделью ИМ. Также обнаружено снижение выраженности нарушений болевой чувствительности у 18,2% животных второй серии. Ни у одной крысы не отмечалось восстановления трофики ниже уровня поражения и тазовых функций.

Таким образом, в клиническом статусе животных первых подгрупп определялась отчетливая положительная динамика в двигательной и чувствительной сферах. Регресс выявленных расстройств у крыс вторых подгрупп определялся в значительно меньшей степени.

Морфологические изменения у животных обеих серий касались белого и серого вещества СМ как в зоне очага поражения, так и на отдалении. Эти изменения были представлены всем спектром структурных дефектов нейронов и глиальных элементов – от первичного раздражения до «тяжелых» поражений. Определялась демиелинизация и аксональная дегенерация спинальных проводников. Описанные изменения были в большей степени выражены во второй серии эксперимента, что соответствовало клиническим данным. Следует отметить, что положительная динамика клинических показателей сопровождалась морфологическими признаками восстановления. Эти корреляции были в наибольшей степени представлены в структурах СМГ.

Поражения шейных и поясничных СМГ определялось в обеих сериях, причем только у крыс с наиболее выраженными клиническими нарушениями. Именно у этой выборки животных и исключительно в первых подгруппах обеих серий наблюдалась наиболее отчетливая взаимосвязь между регрессом неврологической симптоматики и структурными признаками регенераторно-репаративных процессов.

Светооптически в клетках СМГ крыс, получавших МС, лишь у одного животного с моделью ИМ и у двух с моделью ТМ были обнаружены изменения клеток по типу отека, у остальных крыс с сенсорным дефицитом клеточная патология не выходила за рамки первичного раздражения (рис. 1).

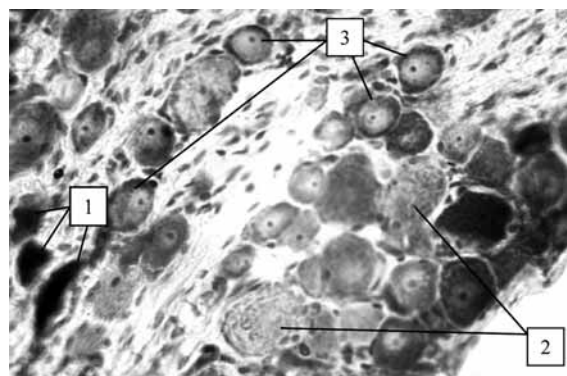


Рис. 1. Участок поясничного СМГ крысы с моделью ИМ после лечения МС: 1 – темные сморщенные нейроны; 2 – нейроны в состоянии острого набухания; 3 – клетки с признаками первичного раздражения. Окраска по методу Ниссля. Ув.×400

При электронно-микроскопическом исследовании СМГ крыс обеих серий после лечения МС почти во всех структурных элементах были обнаружены морфологические признаки различной функциональной активности (рис. 2, 3).

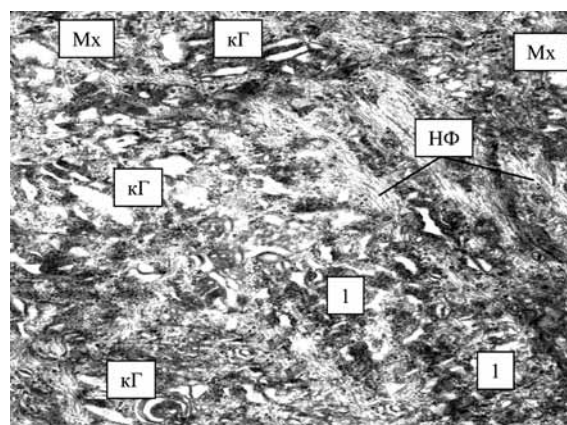


Рис. 2. Гиперхромный нейрон шейного СМГ крысы с моделью ИМ после лечения МС. Состояние функционального торможения: большое количество расширенных канальцев эндоплазматической сети – (1) и комплекса Гольджи (кГ); Мх – вакуолизированные митохондрии; НФ – нейрофибриллы. Электронограмма. Ув.×5000

И, что более важно, в клетках СМГ крыс первых подгрупп обеих серий отмечались характерные признаки восстановления на внутриклеточном уровне. Признаки внутриклеточной репарации были обнаружены не

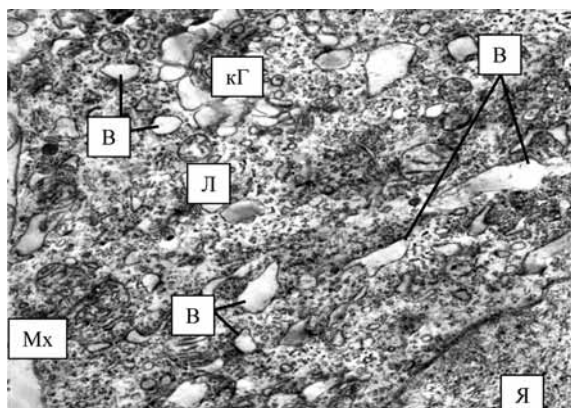


Рис. 3. Нейрон поясничного СМГ крысы с моделью ИМ с признаками высокой функциональной активности после лечения МС: Я – ядро; кГ – расширенные цистерны комплекса Гольджи; В – вакуоли из канальцев гранулярной эндоплазматической сети; Мх – митохондрии с почти типичной структурой, Л – липиды. Электронограмма. Ув.×10 000

только в нейронах, но и в леммоцитах. В частности, в клетках было выявлено наличие большого количества рибосом и полисом, образование канальцев гранулярной эндоплазматической сети от наружного листка кариолеммы, а также лучшая очерченность мембран рибосом (рис. 4).

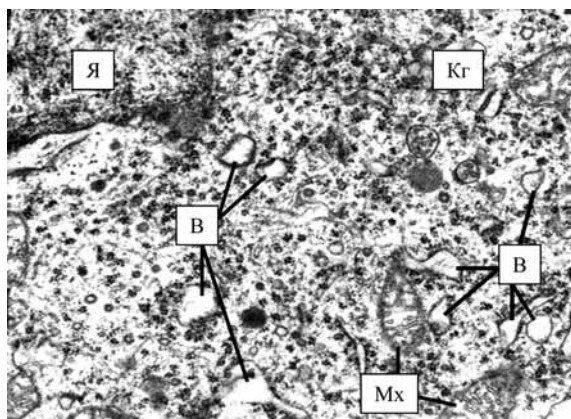


Рис. 4. Нейрон поясничного СМГ крысы с моделью ИМ в состоянии внутриклеточной репарации после лечения МС: Я – ядро; кГ – цистерны комплекса Гольджи; В – вакуоли из канальцев гранулярной эндоплазматической сети; Мх – митохондрии типичной структуры. Электронограмма. Ув.×16 000

У всех животных первых подгрупп при лечении МС встречались леммоциты с признаками увеличения морфофункциональной активности, наблюдалась пролиферация этих клеток, а в миелиновых волокнах при умеренно выраженной миелино-

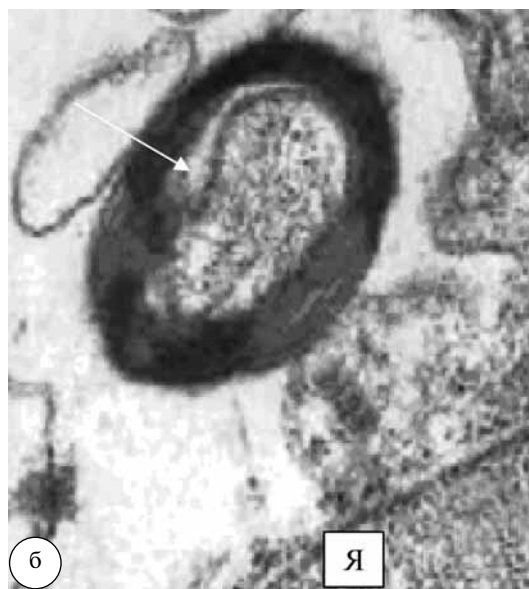
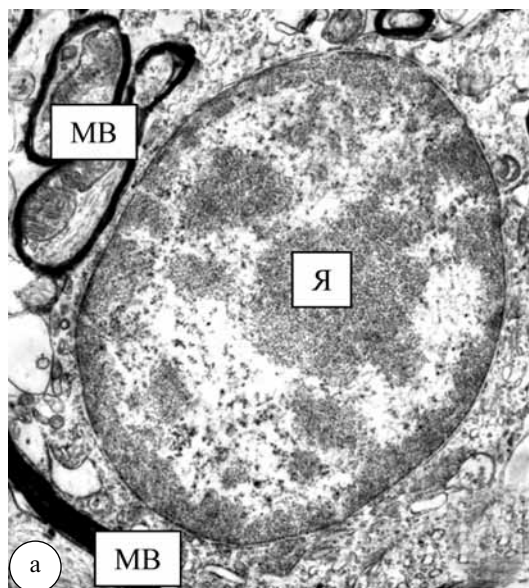


Рис. 5. Поясничный СМГ крысы с моделью ИМ после лечения МС: а – олигодендроцит с типичной структурой ядра (Я), полным набором органоидов в цитоплазме и сохранными миелиновыми волокнами (МВ); б – миелиновое волокно с признаками ремиелинизации (↑). Электронограммы. а: ув.×10 000; б: ув.×40 000

аксонопатии выявлялась картина ремиелинизации (рис. 5, 6).

Важной находкой являлось восстановление в СМГ ультраструктуры не только отдельных синапсов, но и синаптических «бутонов». Определялось восстановление типичной структуры зоны синаптических контактов. В синаптических терминалях выявлялось наличие достаточного количества синаптических везикул и митохондрий с типичной структурой матрикса и крист (рис. 7, 8).

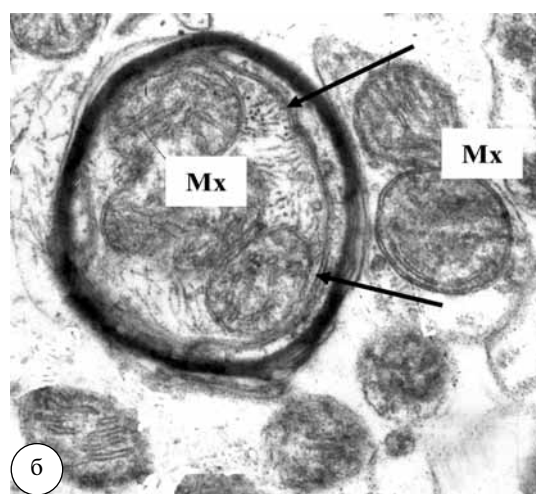
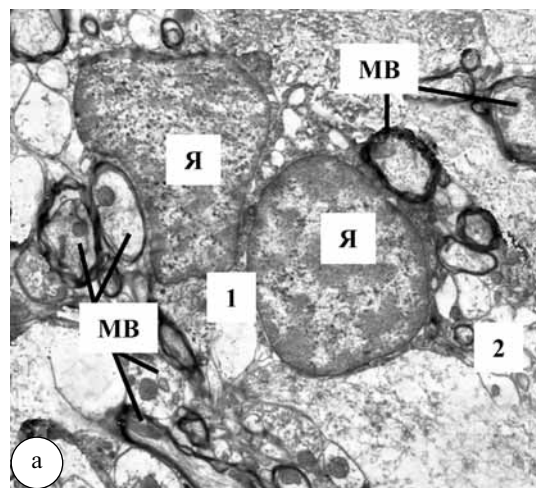


Рис. 6. Поясничный СМГ крысы с моделью ТМ после лечения МС: а – пролиферация леммоцитов (1, 2); Я – ядра леммоцитов; МВ – миелиновые волокна; б – ремиелинизация (↑) МВ; Мх – митохондрии с типичной структурой матрикса и крист.
Электроннограммы. а: ув.×5000; б: ув.×20 000

Заключение. Установлено, что при лечении импульсной МС в первых подгруппах животных отмечалась положительная клиническая динамика, более выраженная у крыс со структурными изменениями в СМГ. Улучшения, в том числе в двигательной сфере, у этих особей коррелировали с выраженностью регенераторно-репаративных процессов структур СМГ.

Результаты лечения, с одной стороны, служили косвенным подтверждением значимости влияний морфологических изменений в СМГ на центральные двигательные расстройства. С другой стороны, они доказывали терапевтическую эффективность МС при спинальной патологии. По-видимому, помимо непосредственного воздействия на мотонейроны, МС расширяет вход и усиливает интенсивность аф-

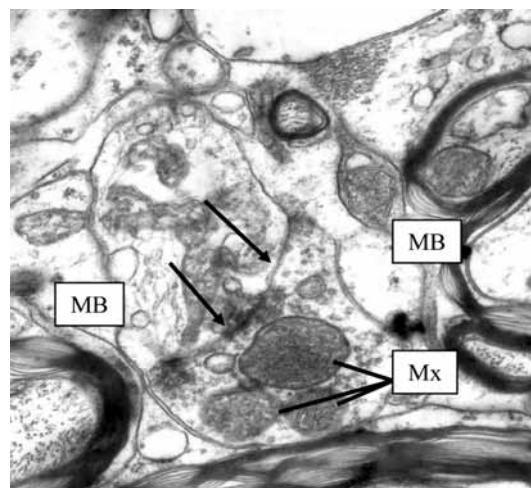


Рис. 7. Поясничный СМГ крысы с моделью ТМ после лечения МС: синапс (↑) с небольшим количеством везикул; Мх – митохондрии с плотным матриксом и неразличимыми кристами; МВ – миелиновые волокна с умеренно миелино- и аксонопатией. Электроннограмма. Ув.×20 000

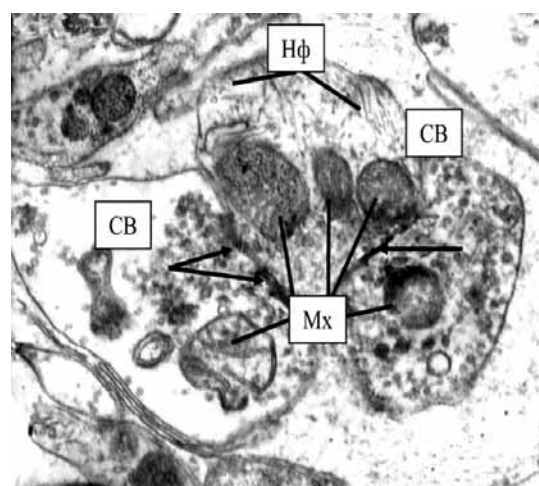


Рис. 8. Синаптический «бутон» в СМГ крысы с моделью ТМ после лечения МС: Мх – митохондрии; СВ – синаптические везикулы; Нф – нейрофибриллы; (↓) – зоны контактов. Электроннограмма. Ув.×20 000

ферентных сигналов. Данный механизм терапевтического действия дает основания использовать МС для лечения центральных двигательных нарушений, связанных с периферической деафферентацией, при любой патологии ЦНС.

Литература

1. Акимов, Г.А. Исследование патоморфологических изменений в нервной системе по методу Б.С. Дойникова / Г.А. Акимов, В.В. Семенова-Тян-Шанская // Архив патологии. – 1953. – Т. 15, вып. 5. – С. 82–86.
2. Искра, Д.А. Периферическая деафферентация при очаговых поражениях центральной нервной системы (особенности патогенеза, клиники, диагностики и лечения двигательных

- расстройств): автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Д.А. Искра. – СПб.: ВМА, 2007. – 44 с.
3. Искра, Д.А. Периферические компоненты парезов лицевой мускулатуры у больных с очаговыми поражениями головного мозга / Д.А. Искра, В.Н. Цыган, М.М. Одинак // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. – 2007. – № 3. – С. 38–43.
 4. Искра, Д.А. Паттерн периферических расстройств в клинической картине экспериментальной ишемической миелопатии / Д.А. Искра [и др.] // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. – 2009. – № 4. – С. 131–136.
 5. Миронов, А.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / А.А. Миронов, Я.Ю. Комиссарчик, В.А. Миронов. – СПб.: Наука, 1995. – 285 с.
 6. Скоромец, А.А. Сосудистые заболевания спинного мозга / А.А. Скоромец [и др.]. – СПб.: СОТИС, 1998. – 526 с.
 7. Шапкина, Е.Ю. Электростимуляция спинного мозга с эффектом «шагания» как метод восстановления локомоторной активности при вертеброгенных миелопатиях / Е.Ю. Шапкина, А.Ю. Мушкин // Мед. техника. – 2002. – № 6. – С. 29–32.
 8. Шмырев, В.И. Клинико-функциональное значение периферических компонентов постинсультного двигательного пареза / В.И. Шмырев, А.С. Васильев // Кремлевская медицина. Клин. вестн. – 2003. – № 2. – С. 15–20.
 9. Anand, S. Transcranial magnetic stimulation: neurophysiological applications and safety / S. Anand, J. Hotson // Brain. cogn. – 2002. – Vol. 50. – P. 366–386.
 10. Huang, C.Y. Characterization of the mechanical and neural components of spastic hypertonia with modified H reflex / C.Y. Huang, C.H. Wang, I.S. Hwang // J. electromyogr. kinesiol. – 2006. – Vol. 16, № 4. – P. 384–391.
 11. Tadahiko, A. [Microangiographic study of the influence of kyphosis on the system of anterior vertebral artery in cases of kyphosis in two-legged rats] / A. Tadahiko // J. kyorin. med. soc. – 1989. – Vol. 20, № 1. – P. 23–33.

D.A. Iskra, L.S. Onishenko

Morphologic correlates of therapeutic effects of magnetic stimulation of spinal structures in experimental traumatic and ischemic myelopathy

Abstract. A comparative analysis of clinical and morphological parameters of treatment by the method of magnetic stimulation of spinal structures was carried out on models of traumatic and ischemic myelopathy (21 and 16 rats). The revealed complex of neurological disorders confirmed the validity of the models chosen for the experiment. It was established a relationship between the severity of neurological disorders and structural changes not only in the tissues of spinal cord, but also in the cells of spinal ganglia and their dendrites. Magnetic stimulation proved to be an effective treatment for ischemic and traumatic myelopathy in the experiment. The degree of functional recovery correlated with the severity of morphological signs of regenerative-reparative processes. The most significant structural changes in treatment by the method of magnetic stimulation were determined in the spinal ganglia of the rats from both series of the experiment. The volume of functional recovery in these animals was the most significant.

Key words: ischemic myelopathy, traumatic myelopathy, magnetic stimulation, spinal cord, spinal ganglion, electron microscopy, neuron, myelin fiber.

Контактный телефон: +7-921-935-02-73; e-mail: iskradm@mail.ru