

Морфофункциональная оценка действия L-лизина эсцината при экспериментальной ишемии спинного мозга у крыс

Г.В. Пономарев, А.А. Шмонин, А.Г. Шумеева, К.Т. Алиев, Т.Д. Власов, Е.В. Мельникова, А.А. Скоромец

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;
ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург)

Введение. Ишемия спинного мозга (ИСМ) сопровождается тяжелыми, стойкими неврологическими и соматическими расстройствами. В статье рассматривается потенциальный нейропротекторный эффект L-лизина эсцината.

Цель исследования. Определить влияние L-лизина эсцината на функциональное восстановление и морфологическую картину спинного мозга белых крыс с моделированной ИСМ.

Материалы и методы. Ишемию спинного мозга создавали перевязкой инфраренального отдела брюшной аорты у крыс двух экспериментальных групп: в контрольной группе (n=8) проводили перевязку аорты, в опытной группе (n=8) проводили перевязку аорты с предварительным введением L-лизина эсцината внутривентриально в дозе 0,14 мг/кг за 30 мин до ишемии.

Результаты. Показан выраженный и статистически значимый нейропротективный эффект L-лизина эсцината, выражающийся клинически в уменьшении неврологического дефицита, морфологически – в увеличении числа нормохромных нейронов и уменьшении сморщенных нейронов и клеток-теней (p<0,01), а также в подавлении отека вещества спинного мозга.

Заключение. L-лизина эсцинат обладает нейропротективным эффектом при экспериментальной ишемии спинного мозга у крыс.

Ключевые слова: спинной мозг, ишемия, модель, нейроны, L-лизина эсцинат.

Введение

В общей структуре неврологической патологии доля ишемических поражений спинного мозга относительно невелика и составляет от 3 до 5% [2], однако столь небольшая распространенность нивелируется инвалидизирующими неврологическими и соматическими осложнениями, встречающимися практически в 100% случаев острой миелоишемии.

Большинство зарубежных исследователей ассоциируют развитие ишемии спинного мозга (ИСМ) в первую очередь как осложнение оперативного лечения на грудном и брюшном отделах аорты [8, 13–15], встречающееся в 2–38% случаев. Тем не менее данная точка зрения не совпадает с отечественными литературными источниками [5], рассматривающими ятрогенную причину ИСМ в последнюю очередь. Ведущими причинами ИСМ отечественными авторами представляются компрессионные (дискогенная миелоишемия) и сосудистые (врожденная и приобретенная патология аорты, спинальные дуральные артериовенозные фистулы) факторы. Ишемические изменения в спинном мозге вторичного характера развиваются и при позвоночно-спинномозговой травме [9].

В этой связи изучение дополнительных механизмов лечения при ИСМ приобретает особую значимость. При этом одним из главных методов изучения остается эксперимент [10].

В зарубежной и отечественной литературе описано множество методов лечения экспериментальной ИСМ. Миелопротективный эффект в эксперименте показали такие

лекарственные препараты, как агонисты аденозиновых рецепторов (циклогексиладенозин, циклопентиладенозин), селективные β_1 -адренолитики (эсмолол, ландиолол) [6, 15], биологически активные вещества эритропоэтин и гепарин [1, 13], а также некоторые неметикаментозные методы лечения: магнитная стимуляция [2], лазерное излучение [1], прекондиционирование [16] и гипотермия [8, 14].

Основные усилия в фармакологической защите спинного мозга при ишемии сосредоточены на коррекции микроциркуляции [6, 7]. Поэтому логичен и актуален поиск препаратов, обеспечивающих как непосредственную защиту нейронов, так и стабилизацию сосудистого и микроциркуляторного русла спинного мозга. В связи с этим особый интерес представляет лекарственный препарат L-лизина эсцинат, доказавший свою эффективность при заболеваниях нервной системы. Препарат понижает активность лизосомальных гидролаз, что предупреждает расщепление мукополисахаридов в стенках капилляров и в соединительной ткани, которая их окружает, и таким образом нормализует повышенную сосудисто-тканевую проницаемость и оказывает антиэкссудативное и обезболивающее действие. В целом позитивное фармакологическое воздействие L-лизина эсцината заключается в противоотечном действии, нормализации микроциркуляции и лимфооттока, уменьшении воспалительной реакции. Было показано, что препарат существенно уменьшает отек–набухание головного и спинного мозга, а также мозговых оболочек, устраняет сжатие и дислокацию структур мозга, снижает внутричерепную гипертензию [4]. В связи с этим применение L-лизина эсцината в условиях экспериментальной ИСМ представляется особенно актуальным.

Цель нашего исследования – изучение влияния L-лизина эсцината на функциональное восстановление и морфологическую картину спинного мозга белых крыс с моделированной ИСМ.

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). Все оперативные вмешательства проведены под общей анестезией хлоралгидратом (300 мг/кг), введенным внутривенно.

Исследование проводили на самцах крыс стока Wistar массой 300 г (n=16). Моделирование ишемии в нижнем артериальном бассейне спинного мозга осуществляли по описанной методике [3]: у анестезированных животных выполнялась лапаротомия, выделялся инфраренальный отдел брюшной аорты, который перевязывали шовной нитью. Операционная рана ушивалась. Животные помещались в клетку по одному.

L-лизина эсцинат («Arterium») вводили внутривенно в дозе 0,14 мг/кг за 30 мин до перевязки инфраренального отдела аорты, исходя из суточной дозировки препарата для взрослых 10 мг (10 мг).

Двигательную функцию задних конечностей животных оценивали через 48 час по шкале Тарлова [3]. После оценки неврологического статуса животное наркотизировалось, затем проводили перфузионную фиксацию тканей 4% раствором параформальдегида на фосфатном буфере. Далее послойно препарировали мягкие ткани поясничного отдела и выделяли позвоночник. После ламинэктомии и пересечения спинномозговых корешков извлекали из позвоночного канала спинной мозг, пояснично-крестцовый отдел (L2-S4) подвергали стандартной гистологической обработке, после чего срезы толщиной 5 мкм окрашивали тионином по методике Ниссля. Далее с помощью прямой микроскопии (Leica DM750) при увеличении $\times 100$, $\times 400$ подсчитывали все нейроны, попавшие в срез, подразделяя их на нормохромные, гиперхромные, гипохромные, сморщенные и клетки-тени. Основной подсчет осуществлялся в клеточных группах передних рогов спинного мозга: передних и задних медиальных, передних и задних латеральных, а также в центральных с обеих сторон.

Все экспериментальные животные были разделены на две группы:

1) контрольная группа (n=8) – осуществляли перевязку инфраренального отдела брюшной аорты, оценку неврологического дефицита и гистологическое исследование срезов пояснично-крестцового отдела спинного мозга;

2) опытная группа (n=8) – проводили те же процедуры, что и в контрольной группе, но с предварительным введением L-лизина эсцината внутривенно в дозе 0,14 мг/кг.

Проводилась статистическая обработка результатов исследования. Для сравнения двух независимых выборок был использован непараметрический тест Манна–Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0,01$. Результаты представлены в виде диаграмм «с размахом».

Результаты

Исходно у всех экспериментальных животных не наблюдалось неврологического дефицита. При моделировании ИСМ по предложенной методике у крыс контрольной группы через 48 час наблюдалась грубая неврологическая симптоматика, соответствующая минимальному количеству баллов по шкале Тарлова и выражающаяся в двигательных расстройствах – от умеренного заднего парализа до задней параплегии, сопровождающаяся гипалгезией с задних конечностей и нарушением функции тазовых органов в виде недержания мочи и кала. Введение препарата L-лизина эсцината внутривенно в дозе 0,14 мг/кг значительно ($p=0,0095$) уменьшало неврологический дефицит у крыс второй опытной группы. У данных особей наблюдали незначительные неврологические симптомы в виде легкого (редко – умеренного) заднего парализа, у 2 животных пареза не наблюдали. Результат оценки двигательной функции задних конечностей (по шкале Тарлова) у крыс контрольной и опытной групп представлен на рис. 1.

Морфологическое изучение срезов выявило отчетливые ишемические изменения нейронов пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга крыс контрольной группы с перевязкой инфраренального отдела аорты, наиболее выраженная ишемия была в нейронах передних рогов. Патологические изменения характеризовались не обширным перикалликулярным отеком серого вещества, преимущественно в области передних рогов, с явлениями гемостаза (рис. 2), в нейронах наблюдали такие патологические изменения, как кариолизис, тотальный хроматозис, уменьшение размера клеток, их сморщивание и появление клеток-теней. Часть нейронов имели гиперхроматические изменения структуры. Вблизи сморщенных нейронов наблюдали реактивные изменения глии, выражающиеся в пикнозе ядра и уменьшении размера клеток.

На фоне превентивного введения препарата L-лизина эсцината в цитоархитектонике пояснично-крестцовых сегментов крыс опытной группы отмечались незначительные

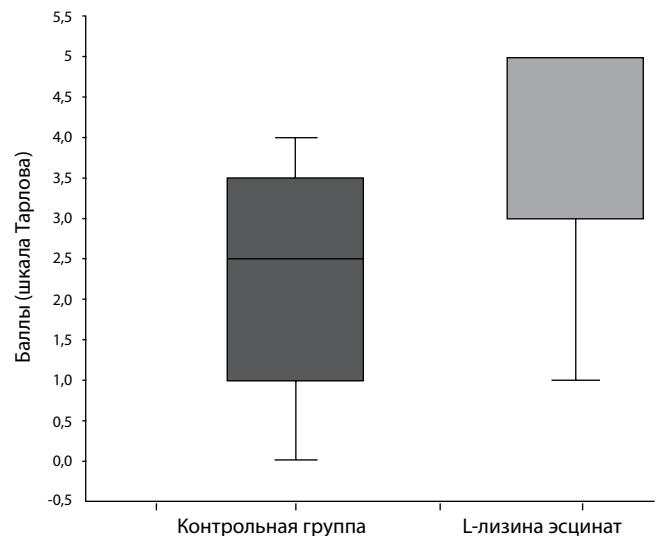


рис. 1: Оценка двигательной функции задних конечностей в контрольной и опытной группах по шкале Тарлова.

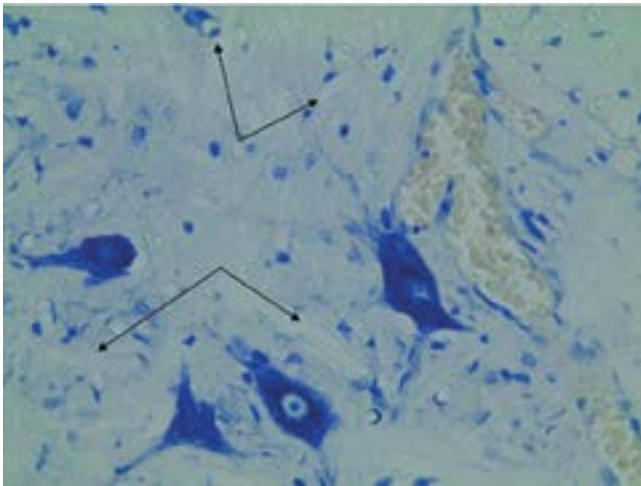


рис. 2: Перичеллюлярный отек (обозначен стрелками), явления гемостаза в области передних рогов спинного мозга животных контрольной группы. Окраска по Нисслию, увеличение $\times 400$.

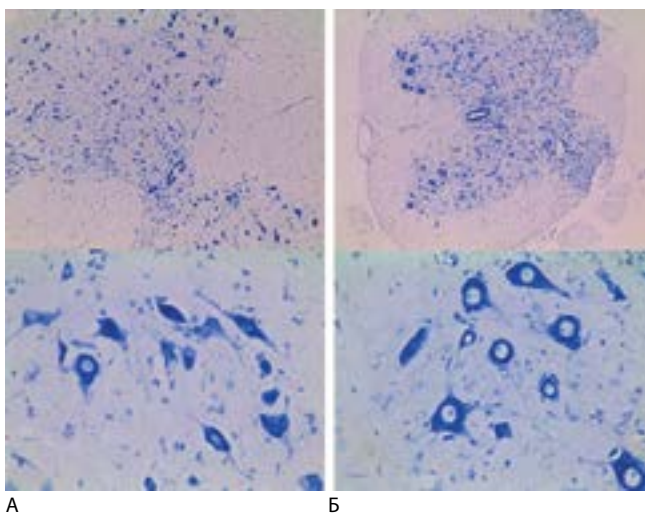


рис. 3: Сравнение цитоархитектоники L4-L5 срезов пояснично-крестцового отдела спинного мозга лабораторных животных. Окраска по Нисслию, сверху – увеличение $\times 100$; снизу – увеличение $\times 400$, центральная группа нейронов переднего рога. А – контрольная группа; Б – опытная группа.

ишемические изменения в виде появления гиперхромных и, в меньшей степени, гипохромных нейронов. Сравнительные морфологические изменения в опытной и контрольной группах представлены на рис. 3. Примечательно, что отек вещества спинного мозга и гемостатические явления в нем у этих животных были выражены минимально. При сравнении нейронального пула в обеих экспериментальных группах с использованием критерия Манна-Уитни получены следующие результаты: в контрольной группе наблюдалось большее количество сморщенных нейронов ($p=0,0006$) и клеток-теней ($p=0,004$), число гипохромных клеток было достоверно больше ($p=0,572$). В опытной группе животных, получивших L-лизина эсцинат, наблюдались преимущественно нормохромные нейроны ($p=0,0006$) (рис. 4).

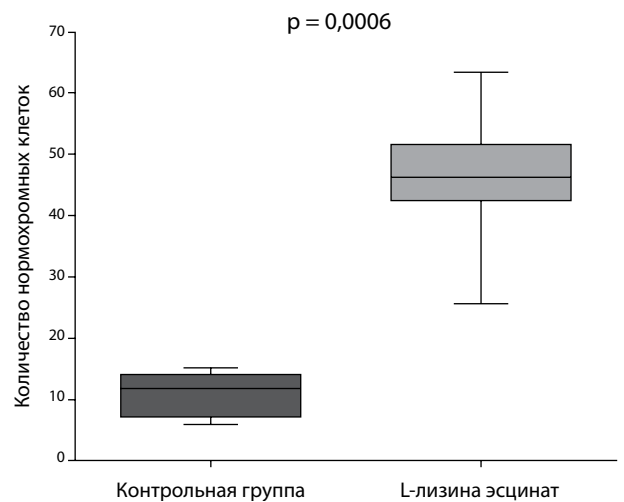
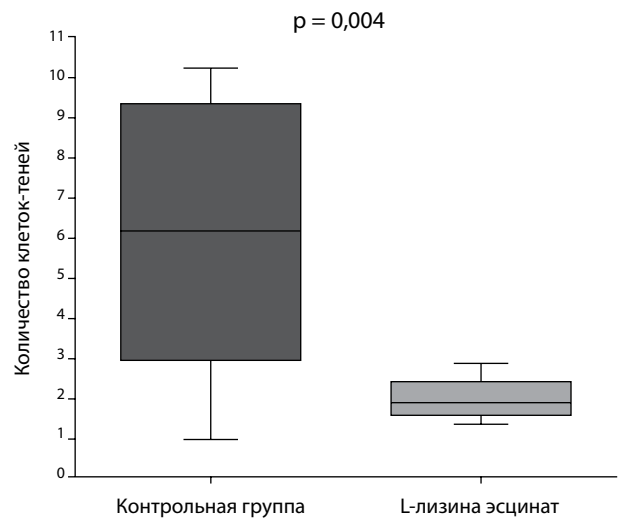
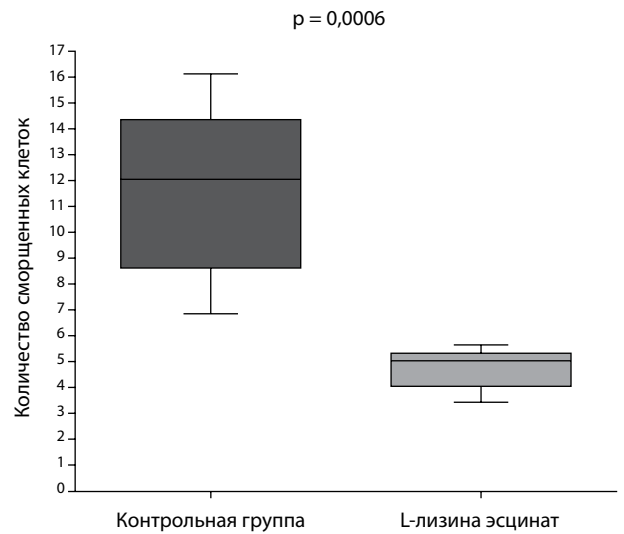


рис. 4: Результаты морфометрии нейронов спинного мозга крыс в контрольной группе и при введении L-лизина эсцината. А – сморщенные нейроны; Б – клетки-тени; В – нормохромные нейроны.

Примечание: статистические параметры – медиана (процентиль 25 и 75).

Обсуждение

В последние годы повышается внимание к проблеме ишемического поражения спинного мозга, что обусловлено появлением новых данных о расстройствах гемодинамики в спинном мозге и разработке новых эффективных лекарственных препаратов, например, рецепторного и венозного действия, способных защищать нервную ткань от ишемии. Для исследования патофизиологических механизмов повреждения спинного мозга и испытания лекарственных препаратов с нейропротекторной активностью используют различные экспериментальные модели ишемии спинного мозга [8]. Такое моделирование миелоишемии у крыс является более перспективным в связи со сходством кровоснабжения спинного мозга у этих животных и человека, при наличии одной передней и двух задних спинальных артерий. В то время как, например, у кроликов кровоток преимущественно сегментарный [11]. Экспериментальная ИСМ, по данным литературы, сопровождается характерными морфологическими изменениями белого и серого вещества нервной ткани в виде появления отека, хроматолиза, сморщенности нейронов, клеток-теней и др.

Ангиопротективные свойства препарата L-лизина эсцината были отмечены в клинических исследованиях [5]. Препарат улучшает эластичность вен, повышает тонус веноз-

ных сосудов, нормализует реологию крови, стимулирует антиромботическую активность сыворотки, улучшает микроциркуляцию. В нашем исследовании подтвержден нейропротективный эффект L-лизина эсцината при экспериментальной ИСМ у крыс, выражающийся как клинически — в виде уменьшения степени неврологического дефицита, так и морфологически — в достоверном увеличении числа нормохромных нейронов и уменьшении сморщенных нейронов и клеток-теней, а также в подавлении отека вещества спинного мозга и гемостаза. Можно предполагать, что улучшение микроциркуляторного кровообращения и стимуляция коллатерального ангиогенеза оказывают нейротрофическое действие, защищая нейроны от гипоксии и их гибели.

Таким образом, в нашем исследовании показан нейропротективный эффект препарата L-лизина эсцината в условиях экспериментальной миелоишемии. Полученные данные позволяют рассматривать L-лизина эсцинат как перспективный лекарственный препарат для клинического использования с целью защиты спинного мозга при сосудистой миелопатии.

Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Г.А. Изыкиной, доктору ветеринарных наук, доценту М.Н. Мальцевой, кандидату биологических наук, доценту Е.В. Вербицкой за помощь в проведении исследования.

Список литературы

1. Володченко А.М., Гиниатуллин Р.У., Козель А.И. и др. Патоморфологическая и функциональная оценка нового метода лечения ишемии спинного мозга (экспериментальное исследование). Вестник ЮУрГУ. Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура». 2015; 15 (3): 53–59.
2. Искра Д.А., Онищенко Л.С. Морфологические корреляты терапевтических эффектов магнитной стимуляции спинномозговых образований при экспериментальной травматической и ишемической миелопатии. Вестник Российской военно-медицинской академии 2012; 2 (38): 56–61.
3. Пономарев Г.В., Шмонин А.А., Алиев К.Т. и др. Экспериментальная модель ишемии спинного мозга у крыс при окклюзии брюшной аорты ниже почечных артерий. Трансляционная медицина 2014; 4: 40–45.
4. Скоромец А.А., Бубнова Е.В., Ендальцева С.М. и др. L-лизина эсцинат при дискогенно-венозной люмбосакральной радикуломиелоишемии. Журнал международной медицины. Неврология. Психиатрия 2014; 4 (9): 1–11.
5. Скоромец А.А., Скоромец А.П., Скоромец Т.А., Тиссен Т.П. Спинальная ангионеврология. М.: МЕДпресс-информ, 2003.
6. Суфианова Г.З., Усов Л.А., Суфианов А.А. и др. Защитное действие А-агонистов на малоинвазивной модели ишемии спинного мозга у крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология 2003; 66 (1): 23–26.
7. Суфианова Г.З., Шапкин А.Г. Повреждение нервной ткани: механизмы, модели, методы оценки. М.: Изд. РАМН, 2014.
8. Herlambang B., Orihashi K., Mizukami T. et al. New method for absolute spinal cord ischemia protection in rabbits. J. Vasc. Surg. 2011; 54: 1109–1116. DOI: 10.1016/j.jvs.2011.04.043. PMID: 21890303.

9. 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; 50: 288–292. DOI: 10.3340/jkns.2011.50.4.288. PMID: 22200008.
10. Kakinohana M., Kida K., Minamishima S. et al. Delayed paraplegia after spinal cord ischemic injury requires caspase-3 activation in mice. Stroke 2011; 42: 2302–2307. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.600429. PMID: 21700940.
11. Kanellopoulos G.K., Xu X.M., Hsu C.Y. et al. White matter injury in spinal cord ischemia protection by AMPA/Kainate Glutamate Receptor Antagonism. Stroke 2000; 31: 1945–1952. PMID: 10926962.
12. Karadottir R., Cavellier P., Berqersen L.H. et al. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischemia. Nature 2005; 438: 1162–1166. DOI: 10.1038/nature04302. PMID: 16372011.
13. 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; 17: 522–530. PMID: 23467953
14. Saito T., Saito S., Yamamoto H., Tsuchida M. Neuroprotection following mild hypothermia after spinal cord ischemia in rats. J. Vasc. Surg. 2013; 57: 173–181. DOI: 10.1016/j.jvs.2012.05.101. PMID: 23182159.
15. Umehara S., Goyagi T., Nishikawa T. et al. Esmolol and landiolol, selective β 1-adrenoreceptor antagonists, provide neuroprotection against spinal cord ischemia and reperfusion in rats. Anesth. Analg. 2010; 110: 1133–1137. DOI: 10.1213/ANE.0b013e3181cdb06b. PMID: 2010354.
16. 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. ScientificWorldJournal. 2004; 4: 892–898. DOI: 10.1100/tsw.2004.186. PMID: 15523562.

Morphological and functional assessment of the effect of L-lysine aescinat in rats with experimental ischemia of the spinal cord

G.V. Ponomarev, A.A. Shmonin, A.G. Shumeeva, K.T. Aliyev, T.D. Vlasov, E.V. Mel'nikova, A.A. Skoromets

*I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia
V.A. Almazov North-West Federal Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

Keywords: spinal cord, ischemia, model, neurons, L-lysine aescinat.

Background. Spinal cord ischemia (SCI) is accompanied by severe persistent neurological and physical disorders. The article discusses potential neuroprotective effect of L-lysine aescinat.

Objective: to assess the effect of L-lysine aescinat on the functional recovery and morphological picture of spinal cord in white rats with simulated SCI.

Methods. Spinal cord ischemia was induced by ligation of the infrarenal abdominal aorta in two experimental groups of rats. In the control group (n=8), aorta was ligated; in the experimental group (n=8), L-lysine aescinat was injected intraperitoneally at

a dose of 0.14 mg/kg 30 minutes before ischemia, followed by ligation of aorta.

Results. Pronounced and statistically significant neuroprotective effect of L-lysine aescinat was demonstrated, which clinically manifested as neurological deficit reduction and morphologically manifested as increased number of normochromic neurons and decreased number of shrunken neurons and shadow-cells ($p < 0.01$), as well as suppression of edema of the spinal cord substance.

Conclusion. L-lysine aescinat has a neuroprotective effect in rats with experimental ischemia of the spinal cord.

Контактный адрес: Пономарев Григорий Вячеславович – очный аспирант кафедры неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого 6–8, к. 10. Тел./факс: +7 (812) 338-60-49, e-mail: grigoryponomarev@yandex.ru;

Шмонин А.А. – асс. кафедры неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, старш. научн. сотр. Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Шумеева А.Г. – студ. 6-го курса лечебного факультета ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;

Алиев К.Т. – докторант каф. неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;

Власов Т.Д. – зав. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;

Мельникова Е.В. – проф. каф. неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;

Скоромец А.А. – академик РАН, зав. кафедрой неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.