

## АССОЦИАЦИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СПИНАЛЬНОМ ИНСУЛЬТЕ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА

Осиков М.В.<sup>1</sup>, Володченко А.М.<sup>2</sup>, Гиниатуллин Р.У.<sup>3</sup>, Федосов А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, e-mail: prof.osikov@yandex.ru;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Областная клиническая больница № 3», Челябинск, e-mail: okb3@okb3-74.ru;

<sup>3</sup>ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», Челябинск, e-mail: laser-chelyabinsk@yandex.ru

Плейотропные эффекты эритропоэтина (ЭПО) при различной патологии являются предпосылкой для исследования его нейропротекторных свойств при ишемических поражениях ЦНС. Цель работы – оценить взаимосвязь неврологических и морфологических изменений при экспериментальной ишемии спинного мозга в условиях системного применения ЭПО – реализована на 54 нелинейных крысах. Спинальный инсульт моделировали тотальной интравазальной окклюзией брюшной аорты и ее ветвей, ЭПО вводили внутривентрикулярно в дозе 5000 МЕ/кг через 3, 24 и 48 ч от индукции спинального инсульта. На 3, 7, 14 и 30 сутки спинального инсульта исследовали неврологический статус по 6-балльной шкале с расчетом интегрального показателя поведенческих реакций (ИПР), морфологию спинного мозга с помощью программы «ДиаМорфCito-W» (Россия). Установлено, что при экспериментальном спинальном инсульте снижается ИПР, развиваются симметричная парапарезия по периферическому типу, недержание мочи и кала, исчезает температурная чувствительность; в спинном мозге снижается количество нормальных нейронов, увеличивается количество нейронов с хроматолизом, клеток-теней, глиальных клеток, кровеносных сосудов. Применение при спинальном инсульте ЭПО приводит к восстановлению двигательной активности, температурной чувствительности у животных, что находит отражение в увеличении ИПР; морфологическим субстратом нейропротекторных эффектов ЭПО выступают увеличение в спинном мозге количества нормальных нейронов, глиальных клеток, кровеносных сосудов и снижение количества клеток с хроматолизом, клеток-теней. С использованием корреляционного анализа продемонстрирована ассоциация между ИПР и морфологическими изменениями в спинном мозге при спинальном инсульте, а также при спинальном инсульте на фоне применения ЭПО.

Ключевые слова: спинальный инсульт, неврологический статус, морфология спинного мозга, эритропоэтин.

## ASSOCIATION OF NEUROLOGICAL AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN EXPERIMENTAL SPINAL STROKE ON THE BACKGROUND OF ERYTHROPOETIN ADMINISTRATION

Osikov M.V.<sup>1</sup>, Volodchenko A.M.<sup>2</sup>, Giniatullin R.U.<sup>3</sup>, Fedosov A.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, e-mail: prof.osikov@yandex.ru;

<sup>2</sup>Chelyabinsk Regional Hospital № 3, Chelyabinsk, e-mail: okb3@okb3-74.ru

<sup>3</sup>Multidisciplinary center of laser medicine, Chelyabinsk, e-mail: laser-chelyabinsk@yandex.ru

Pleiotropic effects of erythropoietin (EPO) in various pathologies become the prerequisite to the study of its neuroprotective properties in ischemic damages of the central nervous system. The aim of the study was to evaluate the interrelation of neurological and morphological changes in cases of experimental ischemia of the spinal cord in terms of systemic EPO administration to 54 nonlinear rats. Spinal stroke (SS) was modeled by means of total endovascular occlusion of the abdominal aorta and its branches, EPO was administered intraperitoneally at a dose of 5000 IU/kg in 3, 24 and 48 hours after SS induction. On the 3rd, 7th, 14th and 30th days of SS the neurological status was examined by a 6-point scale to calculate the integrative indicator of behavioral responses (IBR), to study spinal cord morphology by the program «DiaMorphcito-W» (Russia). The experimental SS showed the decrease of IBR, symmetrical paraplegia of the peripheral type, urinary or fecal incontinence, loss of temperature sensitivity; in spinal cord the amount of normal neurons decreases, the amount of neurons with chromatolysis, shadow cells, glial cells, blood vessels increases. The use of EPO in case of SS restores the motor activity and temperature sensitivity in animals, resulting in IBR increase; the morphological substrate of EPO neuroprotective effects is manifested by an increase of the amount of the normal neurons, glial cells, blood vessels in spinal cord and an amount decrease of cells with chromatolysis, shadow cells. The use of correlation analysis demonstrates the association between IBR and morphological changes in spinal cord in case of SS, as well as in SS on the background of EPO administration.

Keywords: spinal stroke, neurological status, spinal cord morphology, erythropoietin.

Частота развития спинального инсульта (СИ) составляет около 1 % от всех нарушений мозгового кровоснабжения, а соотношение возникновения инсультов головного и спинного мозга (СМ) равно 1:4. Несмотря на низкую частоту развития СИ инвалидизация при ишемии СМ составляет до 30 % от всех случаев заболевания [1]. Зачастую это пациенты с грубыми неврологическими дефицитами в виде параличей и парезов конечностей, с нарушением функции тазовых органов с крайне низким реабилитационным потенциалом, высоким риском развития инфекционных и тромбоземболических осложнений, которые приводят к фатальным последствиям. Проводя анализ современных методов терапии СИ, можно прийти к выводу, что их эффективность остается невысокой, поэтому поиск и введение в практику новых подходов лечения является актуальным для практической медицины. В настоящее время объектом внимания многих специалистов является эритропоэтин (ЭПО), который помимо стимуляции гемопоеза обладает рядом плейотропных негемопоэтических свойств, в том числе нейротропными эффектами [2-4]. Доказано нейропротекторное действие ЭПО при церебральной гипоксии, реализуемое через специфические рецепторы на нейронах и эндотелиоцитах. Система ЭПО – рецептор к ЭПО экспрессируется в ЦНС в ответ на повреждающие факторы, а также при гипоксии. Основные эффекты ЭПО в ЦНС включают восстановление тонуса церебральных сосудов, модуляцию выброса глутамата и снижение уровня глутаматной эксайтотоксичности, стимуляцию ангио- и нейрогенеза, антиапоптотический эффект, что позволяет рассматривать его в качестве универсального тканевого цитокина и использовать в лечении патологии разных органов и систем. ЭПО в настоящее время рекомендован для лечения анемии, но имеет перспективы в терапии ишемических, травматических поражений ЦНС, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и др. [5, 6]. Цель работы – оценить взаимосвязь неврологических и морфологических изменений при экспериментальной ишемии СМ в условиях системного применения ЭПО.

### **Материалы и методы исследования**

Проведен эксперимент на 54 нелинейных крысах разного пола массой 220–250 г, которые содержались 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 ЕС по охране животных, используемых в научных целях, от 22.09.2010 г. Вмешательства проводились под внутримышечным обезболиванием препаратом «Золетил-100» (Virbac «SanteAnimale», Франция). Все животные были случайным образом разделены на 3 группы: группа 1 (n=6) – интактные (контроль), группа 2 (n=24) – животные с СИ,

который моделировали тотальной интравазальной окклюзией брюшной аорты и ее ветвей по методике Суфиановой Г.З. и соавт. [7], группа 3 (n=24) – животные с СИ, которым внутрибрюшинно вводили рекомбинантный человеческий ЭПО («Эпокрин», ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург) в дозе 5000 МЕ/кг через 3, 24 и 48 ч от индукции СИ, суммарная доза введенного ЭПО составила 15000 МЕ/кг. Второй группе животных вводили эквивалентное количество физиологического раствора. Исследования проводили на 3, 7, 14 и 30 сутки. Неврологический статус исследовали по 6-балльной шкале с расчетом интегрального показателя поведенческих реакций (ИППР), который включал оценку двигательной активности передних и задних конечностей, реакцию на температурный раздражитель конечностей и хвоста, сохранение рефлекса позы, имитации восстановления функции обеих конечностей [8]. Срезы СМ окрашивали гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии, по методу Бильшовского – для выявления миелиновых волокон, по методу Ниссля – для верификации тигроидного вещества Ниссля, глиальных клеток. Морфологические исследования выполнены на микроскопе «Leica DMRXA» (Germany) с помощью программы анализа изображений «ДиаМорфСито-W» (Россия); оценивали количество неизменённых (нормальных) нейронов; количество нейронов с хроматолизом; количество клеток-теней; количество глиоцитов; количество мелких кровеносных сосудов (капилляров, артериол). Результаты обрабатывали с помощью пакета программ Statistica 6.0 («StatSoftInc.», USA). Значимость различий в группах оценивали с помощью критериев Манна – Уитни, Краскела – Уоллиса, связь между признаками – коэффициента корреляции Спирмена.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

При СИ у животных на всех сроках наблюдения отмечались симметричная параплегия по периферическому типу, исчезновение температурной чувствительности с задних конечностей и поясничной области, тазовые нарушения в виде недержания мочи и кала. Динамика изменений ИППР при ишемии спинного мозга по сравнению с группой контроля представлена в табл. 1. В динамике наблюдений к 30 суткам СИ определялось медленное восстановление поведенческих реакций: ИППР значимо превышал значение на 3 сутки, но не достигал значений в контрольной группе животных. Результаты морфометрической оценки препаратов поясничного утолщения спинного мозга при СИ представлены в табл. 2. На 3 сутки СИ отмечались выраженные изменения в передних рогах СМ: хроматолиз цитоплазмы, пикноз ядер, растворение глыбок базофильного вещества Ниссля в нейронах с превращением их в клетки-тени, встречались неизменные и гиперхромные нейроны, отмечалась нейронофагия, перицеллюлярный и периваскулярный отек в белом веществе. К 7-м суткам в центральной зоне ишемического

очага количество нормальных нейронов прогрессивно уменьшалось, на 14-е и 30-е сутки ЭИ – значимо увеличивалось, но было ниже, чем в контрольной группе. Число нейронов с хроматолизом, клеток-теней, количество глиальных клеток значительно увеличивалось в динамике на всех сроках эксперимента. Представительство капилляров и артериол было низким на всех сроках СИ, значимо возрастало начиная с 7-х суток эксперимента.

Пусковым фактором в патогенезе инсульта является редукция мозгового кровотока менее 20 мл на 100 г вещества мозга в минуту. Ведущим звеном патогенеза выступает запуск «ишемического каскада», в том числе развитие глутаматной эксайтотоксичности – выброс большого количества возбуждающих нейротрансмиттеров, прежде всего, глутамата, который, связываясь с NMDA и AMPA/каината рецепторами, вызывает открытие кальциевых и натриевых каналов, массивное вхождение внутрь клетки  $Ca^{2+}$  и  $Na^{+}$ . В результате повышения концентрации в нейронах  $Na^{+}$  в клетку поступает вода, происходит набухание и цитотоксический отек нейронов. В результате увеличения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  развивается аноксическая деполяризация мембраны, которая считается главным критерием необратимого поражения клеток. Избыточное количество кальция в цитоплазме запускает каскадные механизмы, приводящие к катаболическому повреждению и гибели нейрона. Кроме этого, кальций адсорбируется на митохондриальных мембранах с последующим блокированием дыхательной цепи электронов, что активирует нелизосомальную цистеиновую протеазу кальпейн, приводит к лизису цитоскелета, деградации энзимов (киназ, фосфолипаз), мембранассоциированных белков. Распад фосфолипидов наружной клеточной мембраны и мембран внутриклеточных органелл индуцирует образование субстратов из каскада арахидоновой кислоты, метаболизм которых значительно активизирует процессы свободнорадикального окисления, перекисного окисления липидов.

Определенную роль в повреждении нервной ткани в очаге ишемии играет запуск реакций воспалительного процесса. Доказано, что миграция лейкоцитов в зону ишемии начинается через 6 ч после реперфузии, они являются источниками цитотоксинов, медиаторов воспаления. Еще одним механизмом гибели нейронов в результате ишемии является апоптоз, он запускается за счет индукции проапоптотогенных генов, активации внутриклеточных протеаз.

Вышеописанные изменения в нейронах характерны для центральной зоны инфаркта – ядра с необратимыми некробиотическими изменениями уже через несколько минут после ишемии. Вокруг ядра формируется зона ишемической полутени, пенумбры, в клетках которой сохранен энергетический метаболизм, но функциональная активность резко снижена. В зоне пенумбры нейроны могут подвергаться некробиотическим изменениям за

счет поступления из зоны инфарктного ядра глутамата, глутаматной эксайтотоксичности, апоптоза и постишемического воспаления. Защитить нейроны от некробиотических изменений в зоне пенумбры можно с помощью применения нейропротекторных препаратов и реперфузии тканей, поэтому зона пенумбры является мишенью для нейропротекции и восстановления кровотока с целью ограничения зоны инфарктного ядра.

В условиях применения ЭПО при СИ уже к 3 суткам, а также на 7, 14 и 30 сутки эксперимента отмечен значительный прирост ИППР по сравнению со 2-й группой животных (табл. 1). Статистически значимые отличия ИППР по сравнению с контрольной группой животных зафиксированы только на 3 сутки наблюдения, а к 30 суткам значения ИППР не отличались от группы интактных животных. Все животные, которые получали ЭПО при СИ, начиная с 3 суток после индукции ишемии спинного мозга, активно передвигались по клетке, обращались к пище и воде. При оценке морфологических изменений в СМ в условиях применения ЭПО уже на 3 сутки отмечалась хорошая сохранность нейронов (табл. 2). Так, количество нормальных нейронов в СМ было более чем в два раза выше по сравнению со 2-й группой животных. На более поздних сроках наблюдения (14 и 30 сутки) сохранялось увеличение числа неизмененных нейронов, отмечалось отсутствие глиосоединительных рубцов, что свидетельствовало о слабо выраженных ишемических повреждениях, без формирования зоны некроза в тканях СМ. Клеточные элементы спинного мозга выглядели более сохранными. Со стороны микроциркуляторного русла отмечалась выраженная пролиферативная реакция, количество кровеносных сосудов статистически значимо увеличивалось при сравнении со второй группой животных на всех сроках эксперимента, а к 30 суткам наблюдения увеличилось в среднем в 2 раза.

При проведении корреляционного анализа установлено, что при СИ количество нормальных нейронов в СМ во все сроки наблюдения снижается по мере падения показателя ИППР. Количество нейронов с хроматолизом увеличивается по мере снижения ИППР на 7 сутки СИ, аналогичная зависимость наблюдается между ИППР и количеством клеток-теней на 14 и 30 сутки, ИППР и количеством глиальных клеток на 7, 14, 30 сутки СИ. Показательно, что при СИ на 3, 14 и 30 сутки снижение показателя ИППР происходит по мере увеличения количества кровеносных сосудов в СМ. В условиях применения ЭПО при СИ обнаружена ассоциация между показателем ИППР и количеством кровеносных сосудов в СМ на 7, 14, 30 сутки эксперимента, количеством глиальных клеток и нормальных нейронов – на 14 и 30 сутки, количеством нейронов с хроматолизом, количеством клеток-теней – на 7, 14, 30 сутки.

Полагаем, что обнаруженные нейропротекторные эффекты ЭПО при СИ обусловлены наличием рецепторов к ЭПО на нейронах и эндотелиоцитах. Известно, что ЭПО в ЦНС изменяет глутаматный выброс, снижает выраженность NO-зависимых свободнорадикальных процессов, ограничивает гибель нейронов путем апоптоза, стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов с формированием нового сосудистого русла, что в целом значительно увеличивает резистентность нейронов к ишемическому повреждению [9, 10].

Таблица 1

Влияние ЭПО на неврологический статус при спинальном инсульте (M±m, баллы)

Группа 1	Группа 2				Группа 3			
	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
5,9±0,3	0,9±0,4 *	1,5±0,6 *	2,6±0,7 *	2,9±0,5 *,**	5,2±0,4 *,#	5,5±0,5 #	5,7±0,4 #	5,8±0,3 #

Примечание: \* –  $p < 0,05$  при сравнении с группой 1, # - при сравнении с группой 2.

Таблица 2

Влияние ЭПО на морфометрические показатели при спинальном инсульте (M±m, количество / у.е. площади)

Показатели	Группа 2				Группа 3			
	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Кол-во нормальных нейронов	30,2±2,1	24,3±1,1	27,8±1,3	29,9±2,5	69,3±3,1 #	81,1±2,8 *,#	87,7±2,5 *,**,#	90,8±3,5 *,**,#
Кол-во нейронов с хроматолизом	29,3±0,6	36,4±0,9	43,6±2,1	53,8±1,2	25,2±0,4 #	20,1±0,8 *,#	17,1±0,5 *,#	12,2±0,3 *,**,***,#
Кол-во клеток-теней	36,2±2,3	58,1±2,5	63,8±2,8	67,9±2,2	15,2±0,3 #	10,1±0,2 *,#	8,3±0,4 *,**,#	3,8±0,5 *,**,***,#
Кол-во глиальных клеток	92,3±1,9	115,5±2,1	123,4±2,2	112,2±1,9	124,7±2,2 #	135,8±3,2 *,#	143,9±3,1 *,**,#	156,8±3,4 *,**,***,#
Кол-во кровеносных сосудов	4,3±0,2	6,2±0,4	8,1±0,7	10,2±0,6	7,9±0,1 #	11,9±0,2 *,#	16,8±0,5 *,**,#	17,3±0,3 *,**,#

Примечание: # -  $p < 0,05$  при сравнении с группой 2, \* - с 3 сутками в группе 3, \*\* - с 7 сутками в группе 3, \*\*\* - с 14 сутками в группе 3.

Таблица 3

Корреляция между показателями морфометрии и неврологического статуса (ИППР) при  
спинальном инсульте

Показатели	ИППР			
	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки
Кол-во нормальных нейронов	<u><b>R=0,46</b></u> R=0,37	<u><b>R=0,54</b></u> R=0,33	<u><b>R=-0,43</b></u> <b>R=0,86</b>	<u><b>R=0,87</b></u> <b>R=0,55</b>
Кол-во нейронов с хроматолизом	<u>R=-0,17</u> R=-0,20	<u><b>R=-0,43</b></u> <b>R=-0,90</b>	<u>R=-0,31</u> <b>R=-0,43</b>	<u>R=-0,32</u> <b>R=-0,67</b>
Кол-во клеток-теней	<u>R=-0,29</u> <b>R=-0,60</b>	<u>R=-0,26</u> <b>R=-0,49</b>	<u><b>R=-0,37</b></u> <b>R=-0,49</b>	<u><b>R=-0,35</b></u> <b>R=-0,47</b>
Кол-во глиальных клеток	<u>R=-0,12</u> R=0,02	<u><b>R=-0,77</b></u> R=0,37	<u><b>R=-0,54</b></u> <b>R=0,43</b>	<u><b>R=-0,81</b></u> <b>R=0,41</b>
Кол-во кровеносных сосудов	<u><b>R=-0,46</b></u> R=0,16	<u>R=-0,20</u> <b>R=0,86</b>	<u><b>R=-0,60</b></u> <b>R=0,57</b>	<u><b>R=-0,55</b></u> <b>R=0,74</b>

Примечание. В таблице приведены значения коэффициента корреляции Спирмена: в числителе – в группе 2, в знаменателе – в группе 3. Полужирным шрифтом выделена статистически значимая ( $p < 0,05$ ) связь.

### Выводы

1. При экспериментальном СИ снижается ИППР, развиваются симметричная параплегия по периферическому типу, недержание мочи и кала, исчезает температурная чувствительность; в СМ снижается количество нормальных нейронов, увеличивается количество нейронов с хроматолизом, клеток-теней, глиальных клеток, кровеносных сосудов.

2. Применение при СИ ЭПО в суммарной дозе 15000 МЕ/кг приводит к восстановлению двигательной активности, температурной чувствительности у животных, что находит отражение в увеличении ИППР; морфологическим субстратом нейропротекторных эффектов ЭПО выступают увеличение в СМ количества нормальных нейронов, глиальных клеток, кровеносных сосудов и снижение количества клеток с хроматолизом, клеток-теней.

3. С использованием корреляционного анализа обнаружена ассоциация между ИППР и морфологическими изменениями в СМ при СИ, а также при СИ на фоне применения ЭПО.

### Список литературы

1. Неврология: национальное руководство /под ред. Е.И. Гусева, А.Н. Коновалова, В.И. Скворцовой, А.Б. Гехт. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 1040 с.

2. Осиков М.В. Патфизиологический анализ влияния эритропоэтина на психологический статус у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе / М.В. Осиков, К.В. Ахматов, Л.В. Кривохижина // Человек. Спорт. Медицина. – 2010. – № 19 (195). – С. 110-116.
3. Осиков М.В., Плейотропные эффекты эритропоэтина при хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков, В.Ю. Ахматов, Л.Ф. Телешева, А.А. Федосов, Ю.И. Агеев, Л.Г. Суровяткина // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 7-1. – С. 218-224.
4. Осиков М.В. Влияние эритропоэтина на процессы свободнорадикального окисления и экспрессию гликопротеинов в тромбоцитах при хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 1. – С. 30-33.
5. Lombardero M., Kovaes K., Schethauer B.W. Erythropoietin: a hormone with multiple function // Pathobiology – 2011. – Vol.78. – P. 41-53.
6. Taoufik E. TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury / E. Taoufik, E. Petit, D. Divoux et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105(16). – P. 6185-90.
7. Суфианова Г.З., Шапкин А.Г. Повреждение нервной ткани: механизмы, модели, методы оценки / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин. – М.: Изд-во РАМН, 2014. – 288 с.
8. Пашин С.С. Морфофункциональные изменения в спинном мозге крыс после фокального флеботромбоза / С.С. Пашин, И.В. Викторов // Морфология. – 2008. – Т.133, № 1. – С. 35-38.
9. Olsen N.V. Central nervous system frontiers for the use of erythropoietin // Clin. Infect.Dis. – 2003. – Vol. 37. – Suppl.4. – P. 323-330.
10. Ruscer K., Frever D., Karch M et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from in vitro model. // J. Neurosci. – 2002. – Vol.22. – P. 10291-10301.