

ДНЕВНИК

КАЗАНСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ШКОЛЫ

ВЫПУСК

№ I (XXIII)

Казань, 2019

16+

Научно-практический журнал для специалистов в области медицины

УДК: 612.832

**Балтин М.Э., Сабирова Д.Э., Ямалитдинова Э.И.,
Силантьева Д.И., Балтина Т.В.**

Казанский федеральный университет, НИЛ Openlab
Двигательная нейрореабилитация, 420008, г. Казань,
Кремлевская, 18, Россия

Оценка эффективности терапии контузионной травмы спинного мозга у крыс с использованием метилпреднизалона и двигательной тренировки

Резюме. Актуальность исследования. Актуальность проблемы спинномозговых повреждений обусловлена большой их распространенностью, инвалидизацией и высокой смертностью пострадавших. **Цель исследования.** Оценить эффективность комбинированного лечения экспериментальной контузионной травмы спинного мозга у крыс с использованием метилпреднизалона и двигательной тренировки.

Методы исследования. В ходе экспериментов было обследовано 36 не линейных лабораторных крыс-самок. Все эксперименты были выполнены с соблюдением биоэтических норм. Для исследования состояния периферической части нервно-мышечного аппарата и возбудимости спинного мозга проводили оценку амплитуды вызванных ответов (моторного и рефлекторного) икроножной мышцы крысы на стимуляцию седалищного нерва на 3, 7 и 30 сутки после травмы. Двигательная функция оценивалась в открытом поле, используя систему скрининга БББ.

Результаты исследования. В хроническом периоде (30 суток) наблюдали восстановление двигательной активности по шкале БББ в группе с тренировкой на трейдбане и комбинированном лечении. В раннем периоде после травмы спинного мозга наблюдали уменьшение максимальной амплитуды М-ответа икроножной мышцы крысы во всех группах. В хроническом периоде амплитуда М-ответа восстанавливалась в группах с применением двигательной тренировки. Амплитуда Н-ответа во всех группах снижалась, что говорит о снижении возбудимости двигательных центров спинного мозга.

**Baltin M.E., Sabirova D.E., Yamalitdinova E.I.,
Silantyeva D.I., Baltina T.V.**

Evaluation of the effectiveness of the combination of the motor training and methylprednisalone therapy in the contusion spinal cord injury treatment in rats

Abstract. Background. The relevance of research. Due to high prevalence, disability and high mortality of victims the spinal injuries is a urgent problem.

Aim. To evaluate the effectiveness of the combined treatment of experimental spinal cord injury in rats using methylprednisolone therapy and motor training.

Material and methods. During the experiments 36 non-linear female laboratory rats were examined. All experiments were performed in compliance with bioethical norms. To study the state of the peripheral part of the neuromuscular apparatus and excitability of the spinal cord circuits, the analysis of the amplitudes of responses (motor and reflex) of the gastrocnemius muscle evoked by stimulation of the sciatic nerve was performed at 3, 7 and 30 days after injury. The motor function was assessed in the open field using the BBB screening system.

Results of the study. The recovery of motor activity according to the BBB scale was observed in the group with motor training in treadmill and the group with combined treatment during the chronic period (30 days). In the early period after spinal cord injury, a decrease in the maximum amplitude of the M-response of the rat gastrocnemius muscle was observed in all groups. In the chronic period, the amplitude of the M-response was restored in groups using motor training. The amplitude of the H-response decreased in all groups, which indicated a decrease of the excitability of the motor centers of the spinal cord.

Conclusion. Combined therapy with methylprednisolone and motor training had a positive effect on the restoration of the motor functions in the chronic period after contusion

Выводы. Сочетанная терапия метилпреднизолоном и двигательной тренировкой оказывают положительное влияние на восстановление двигательных функций в хроническом периоде после контузионной травмы спинного мозга у крыс.

Ключевые слова: травма спинного мозга, крыса, электрофизиология, метилпреднизолон, двигательная тренировка

injury of the spinal cord in rats.

Keywords: spinal cord injury, rat, electrophysiology, methylprednisolone, motor training

Контактное лицо:

Балтин Максим Эдуардович

аспирант, м.н.с. НИЛ Openlab Двигательная нейрореабилитация Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420012, г. Казань, ул. К. Маркса, 76; тел: 89046613494, e-mail: baban.bog@mail.ru

Контактное лицо:

Балтин Максим Эдуардович

аспирант, м.н.с. НИЛ Openlab Двигательная нейрореабилитация Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420012, г. Казань, ул. К. Маркса, 76; тел: 89046613494, e-mail: baban.bog@mail.ru

Введение. Травма спинного мозга (ТСМ) является разрушительным событием, которое, в зависимости от уровня и степени тяжести, нарушает взаимодействие сенсомоторной и автономной функций [19]. Как правило, в таких условиях целью реабилитационных мероприятий является восстановление самостоятельности пациентов и, таким образом, улучшение качества их жизни. Введение высоких доз метилпреднизолона (МП), которое было рекомендовано на основе Национальных исследований острого повреждения спинного мозга [5;6] является единственным эффективным средством нейропротекции в течение 8 часов после травмы спинного мозга. Тем не менее, было проведено большое количество исследований по протоколам Национальных исследований острого повреждения спинного мозга, которые поставили под сомнение использование предлагаемого протокола терапии метилпреднизолона [1; 10].

Исследования показали, что после ТСМ проходит обширная реорганизация сохранившихся спинальных связей, чтобы увеличить вовлечение проприоцептивных пу-

тей для восстановления двигательных функций, даже при отсутствии терапевтических вмешательств [3; 8]. Повторяющаяся активация определенных сенсомоторных путей по выполнению конкретных задач может усилить схемы и синаптические контакты, используемые для успешного выполнения движения [7; 9]. Таким образом, эти наблюдения позволяют предположить, что активация проприоспинальных путей может быть использована в реабилитации после тяжелой ТСМ. Упражнения, в том числе двигательное обучение, могут стимулировать деятельность в соответствующих группах мышц и центрах нервной системы, что может быть легко присоединено к другим стратегиям лечения, чтобы улучшить восстановление функций после ТСМ. Тем не менее, после ТСМ на сегодняшний день использование таких методов в клинике ограничено мероприятиями ЛФК и физиотерапии. Методы реабилитации, которые сочетали бы в себе лечение, способное предотвратить активацию вторичной травмы и, одновременно, изменить структуру и эффективность синапсов в поврежденной ЦНС, имеют

большие перспективы в оптимизации стратегий функционального восстановления.

Цель исследования. Оценить эффективность комбинированного лечения экспериментальной контузионной травмы спинного мозга у крыс с использованием метилпреднизолона и двигательной тренировки.

Материалы и методы. В ходе экспериментов было обследовано 36 не линейных лабораторных крыс-самок, массой 160-240 граммов. Все эксперименты были выполнены с соблюдением биоэтических норм и одобрены Локальным этическим комитетом федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» протокол №2 от 29.05.2015г. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялись в соответствии с требованиями Директивы Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010г. по защите животных, используемых для на-

учных целей (Directive 2010/63/UE on the protection of animals used of scientific purposes). Все процедуры выполнялись под комбинированным внутримышечным наркозом с использованием золетила («Zoletil 50» «Virbac», Франция), 1 мг/кг и ксилавета инъекционного (ХулаVET, «Pharmamagist Ltd», Венгрия) 0,05 мл/кг – 0,10 мл/кг. Производили стандартную открытую контузионную спинномозговую травму на уровне Th8 по модифицированной методике A.R. Allen (1914) [2]. Все операции проводили в асептических условиях. После проведения ламинэктомии (твёрдая мозговая оболочка оставалась интактной), устанавливали трубку высотой 20 см на корни дужек ламинэктомированного позвонка и опускали внутри нее груз весом 2,5 г с высоты 5 см. Контролем нанесения повреждения являлось мышечное сокращение в нижних конечностях. Падающий груз и трубку после нанесения удара сразу же удаляли. После операции всем животным вводили антибактериальный препарат энрофлон (0,1мл, п/к) и в течение 2х часов выдерживали при температуре 41°C. В послеоперационном периоде у животных с нарушением мочеиспускания механически опорожняли мочевой пузырь дважды в день до восстановления его функции.

Крысы, случайным образом, слепо были распределены на шесть групп: (1) Группа метилпреднизолона (МП; n=7): животные получали

однократную высокую дозу метилпреднизолона сукцината натрия (30 мг/кг) внутривенно (в/в) сразу после травмы, далее через 8 часов после травмы, с последующим повторным введением через 24 и 48 часов после травмы. (2) Группа с отсроченной двигательной тренировкой (ТР, n=7): животные начиная с 14 суток после травмы, проходили курс ежедневной 20 минутной двигательной тренировки на тредбане. (3) Группа с отсроченной двигательной тренировкой + метилпреднизолон (МП+ТР; n=7): сразу после повреждения спинного мозга метилпреднизолон 30 мг/кг вводили (в/в) с последующей отсроченной двигательной тренировкой через 14 суток после травмы. (4) Группа травмы спинного мозга (ТСМ, n=8): животные перенесли ламинэктомию и повреждение спинного мозга. (5) Контрольная группа (n=7): контрольные животные подвергались всем хирургическим процедурам, кроме повреждения спинного мозга. Животным был предоставлен свободный доступ к воде и пище, и они содержались в условиях вивария.

Электромиографическое тестирование. Во всех сериях оно производилось до оперативного вмешательства, в первые 20 минут после контузионной травмы, в остром (1 и 3 сутки), раннем (7, 14, 21 сутки) и хроническом (30 суток) периодах ТСМ. С использованием игольчатых электродов регистрировали Н- и М-ответы икроножной мышцы на

электрическую стимуляцию седалищного нерва справа и слева. Стимулирующие игольчатые электроды вводили в область проекции седалищного нерва, интенсивность стимула варьировала от 0,05 В до 15 В, длительность стимула составила 0,5 мс. Для нанесения стимула, усиления и регистрации ответов была использована экспериментальная установка на базе электромиографа MG-42 фирмы «Медикор» производства ВНР и процессора Pentium.

Для исследования состояния периферической части нервно-мышечного аппарата регистрировали моторный ответ (М-ответ) мышцы. Определяли максимальную амплитуду вызванного ответа. Рефлекторную возбудимость спинальных двигательных центров тестировали методом Н-рефлекса. Определяли максимальную амплитуду ответов. Для более полной характеристики реагирующего пула мотонейронов определяли: отношение максимальных амплитуд моторного и рефлекторного ответов [(Нmax/Мmax)*100%]] [13].

Оценка двигательной функции.

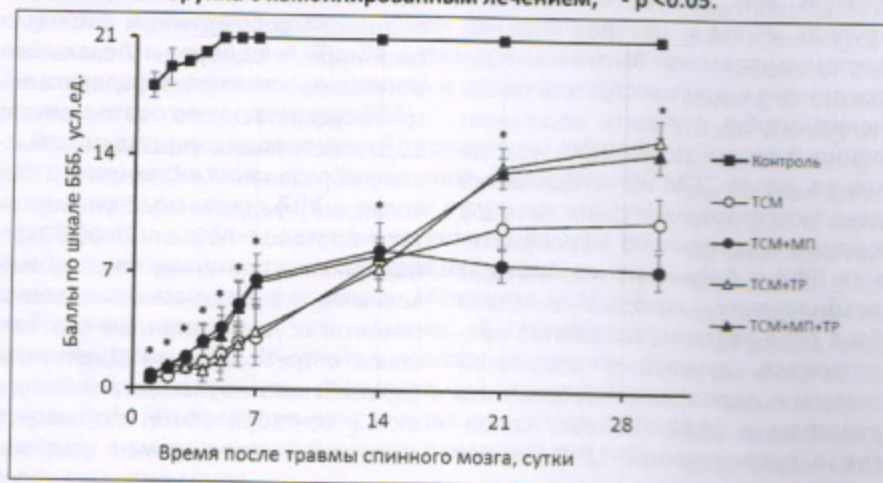
Она оценивалась в открытом поле, используя систему скрининга БББ (шкала Бассо, Битти и Бреснахан [4]). Животных размещали в открытом поле и оценивали функции задних конечностей в течение 4 мин. Нижний уровень шкалы (0-7) соответствует полной плегии конечностей до отдельных совместных движений, далее промежуточный уровень (8-13), соответствующий частичному восстановлению координации движений и высокий (14-21) характеризуется поддержкой веса, координации и нормальным положением лап, соответственно. Оценка проводилась за 24 часа до операции (день 0) и ежедневно, начиная через 24 часа после операции, до тридцатого дня.

Статистическая обработка данных производилась в программе Original Lab. Все данные представлены в виде среднего ± SE. Статистически значимые различия определяли с использованием ANOVA. Уровень критерия статистической значимости был установлен на уровне p<0,05.

Результаты исследования. Анализ двигательной активности в тесте открытое поле показал, что животные до травмы имели нормальную походку (оценка 21 балл). Через 24

Рисунок 1.

Изменение двигательной активности крыс в тесте открытое поле по шкале БББ после травмы спинного мозга в различных экспериментальных группах. Обозначения: ТСМ – группа животных с травмой спинного мозга, ТСМ+МП – экспериментальная группа, получавшая лечение метилпреднизолоном в остром периоде, ТСМ+ТР – группа с двигательной тренировкой в хроническом периоде, ТСМ+МП+ТР – группа с комбинированным лечением; * - p<0.05.



часа после операции у животных всех экспериментальных групп движение в задних конечностях отсутствовало (0 баллов), как и дискретные движения одного или двух суставов (1 балл). Что представлено на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1 при развитии вторичной травмы (3-7 сутки) не было существенного различия между группами с ТСМ и получавших метилпреднизолон. В хроническом периоде (30 суток) видно существенное улучшение в группе с тренировкой на трейдбане и комбинированном лечении.

Изменения параметров М- и Н-ответов икроножной мышцы крысы после травмы спинного

мозга при введении метилпреднизолона.

В раннем периоде после травмы спинного мозга наблюдалось уменьшение максимальной амплитуды М-ответа во всех экспериментальных группах (рис. 2).

Однако, в группе животных с введением метилпреднизолона (на рисунке столбики со штриховкой) амплитуда М-ответа была выше, чем без лекарственной терапии (рис. 2). Так, амплитуда М-ответа в первой группе (ТСМ) уменьшилась к 7 суткам почти в 2 раза ($p < 0.05$). У животных с метилпреднизолоном – на 30% по сравнению с контролем ($p < 0.05$). На 30 сутки после экспериментальной ТСМ у животных 2 группы наблюдали отрицатель-

ный эффект – амплитуда М-ответа снизилась до 40% по сравнению с контролем ($p < 0.05$) (рис. 2), тогда как в группе без лечения наблюдали увеличение амплитуды М-ответа по сравнению с 7 сутками на 30% ($p < 0.05$). Как видно на рисунке 2 использование двигательной тренировки и сочетания двигательной тренировки с метилпреднизолоном (ТСМ+ТР и ТСМ+МП+ТР) оказывало положительный эффект. Так, к 30 суткам в группе 3 и 4 наблюдали восстановление амплитуды М-ответа до контрольных значений. А в группе 4 (сочетанное лечение) амплитуда М-ответа незначительно увеличилась.

Амплитуда Н-ответа, в группе с лечением метилпреднизолоном и без, к 7 суткам снижалась, что говорит о снижении возбудимости двигательных центров спинного мозга (рис. 3).

Как видно на рисунке 3 снижение амплитуды Н-ответа было более выражено при введении метилпреднизолона (ТСМ+МП), так на первые сутки она составила 64% от контроля ($p < 0.05$). Также подтверждением снижения возбудимости центров к 7 суткам после ТСМ было изменение отношения максимальных амплитуд М- и Н-ответа (рис. 4). Видно, что у животных группы 1, не получавших лечение отношение N_{max}/M_{max} и 2 группы, получивших лечение метилпреднизолоном на 7 сутки отношение снизилось в среднем на 7% ($p < 0.05$). Изменение параметров Н-ответа к 30 суткам продемонстрировало снижение рефлекторной возбудимости двигательных центров во всех экспериментальных группах (рис. 3). В группе с лечением метилпреднизолоном – Н-ответ зарегистрировать не удалось. Отношение максимальной амплитуд М- и Н-ответов к 30 суткам было ниже во всех экспериментальных группах. Однако, как видно на рисунке 5 в группе с двигательной тренировкой это значение было самым низким, снижение составило 15% от контроля.

Обсуждение. Сразу же после ТСМ, развитие воспаления и спинального шока, и вовлечение в этот процесс мотонейронов ниже места повреждения приводит к потере движения задних конечностей и рефлексов. После спинального шока происходит постепенное восстанов-

Рисунок 2.

Изменение максимальной амплитуды М-ответа икроножной мышцы крысы при травме спинного мозга. За 100% приняты значения контрольной группы. Остальные обозначения как на рис.1

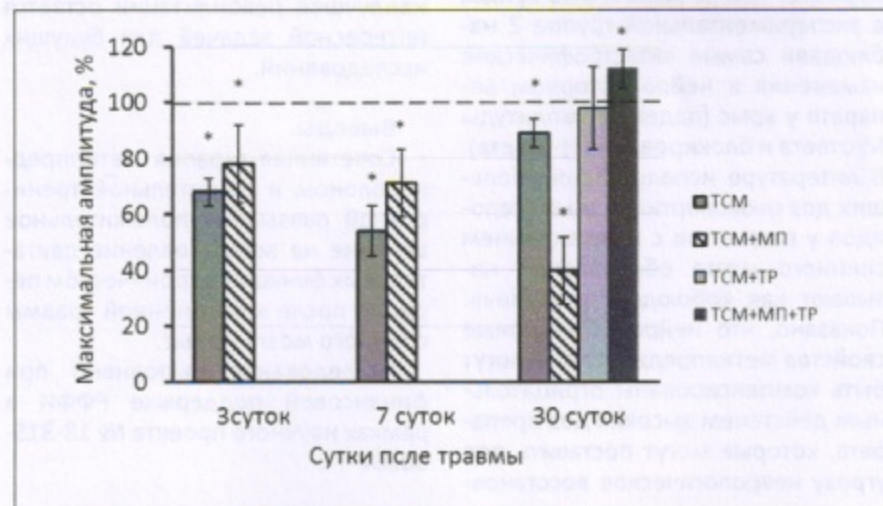


Рисунок 3.

Изменение максимальной амплитуды Н-ответа икроножной мышцы крысы при травме спинного мозга. Обозначения как на рисунке 2.

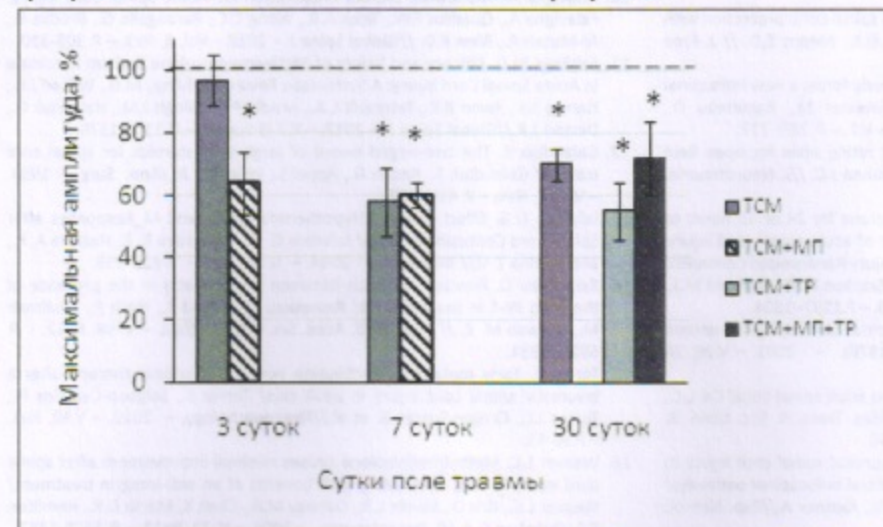
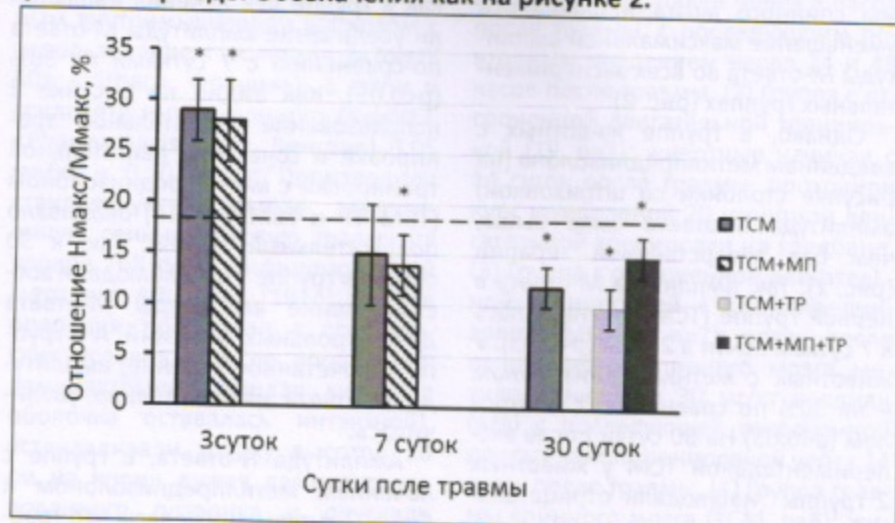


Рисунок 4.

Изменение отношения максимальных амплитуд Н-ответа и М-ответа икроножной мышцы крысы при травме спинного мозга в раннем периоде. Обозначения как на рисунке 2.



ления рефлексов и, в зависимости от тяжести поражения, у животных и человека можно наблюдать спонтанное восстановление некоторых двигательных функций. Метилпреднизолон первоначально был показан для защиты от вторичного повреждения в моделях на животных [1]. В основном, метилпреднизолон используют, чтобы свести к минимуму вторичное повреждение. В нашем исследовании использование метилпреднизолона для лечения в острой фазе не привело к функциональному восстановлению при оценке моторной функции в открытом поле с использованием шкалы БББ, что было показано и в других работах [11;15;16]. Однако изменение максимальной амплитуды

М-ответа может свидетельствовать о нейропротекторном эффекте метилпреднизолона в этом периоде. Тем не менее, к 30 суткам в экспериментальной группе 2 наблюдали самые катастрофические изменения в нейро-моторном аппарате у крыс (падение амплитуды М-ответа и блокирование Н-ответа). В литературе использование больших доз глюкокортикоидных стероидов у пациентов с повреждением спинного мозга обоснованно называют как «обуюдоострый меч». Показано, что нейропротекторные свойства метилпреднизолона могут быть компенсированы отрицательным действием высоких доз препарата, которые могут поставить под угрозу неврологическое восстанов-

ление и даже выживание больных с острым повреждением спинного мозга [12].

Использование двигательной тренировки в хроническом периоде оказало положительный эффект на восстановление двигательных функций. После ТСМ в клинической практике двигательная тренировка является (и, вероятно, останется) неотъемлемой частью любой схемы лечения. В моделях на животных были получены данные, позволяющие предположить, что двигательная тренировка оказывает содействие в регенерации аксонов и запуску процессов нейропластичности [14; 17]. Нами показано, что применение двигательной тренировки привело к улучшению двигательных функций, и одновременное использование тренировки и метилпреднизолона может увеличить эффективное терапевтическое окно. Оптимальное сочетание комбинации методов лечения, для наилучшей реабилитации остается интересной задачей для будущих исследований.

Выводы.

Сочетанная терапия метилпреднизолоном и двигательной тренировкой оказывают положительное влияние на восстановление двигательных функций в хроническом периоде после контузионной травмы спинного мозга у крыс.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00267

Литература.

- Akhtar A.Z. Animal studies in spinal cord injury: a systematic review of methylprednisolone/ Akhtar A.Z., Pippin J.J., Sandusky C.B. // *Altern. Lab. Anim.* - 2009. - V.37, №1. - P.43-62.
- Anderson D.K. Iron-induced lipid peroxidation in spinal cord: protection with mannitol and methylprednisolone// Anderson D.K., Means E.D. // *J. Free Radic. Biol. Med.* - 1985. - V. 1, №1. - P.59-64.
- Bareyre F.M. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats/ Bareyre F.M., Kerschensteiner M., Raineteau O., Mettenleiter T.C. et al.//*Nat. Neurosci.* - 2004. - V.7. - P. 269-277.
- Basso D.M. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats/ Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. // *J. Neurotrauma.* - 1995. - V.12, №1. - P. 1-21.
- Bracken M.B. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tiriladaz mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study/ Bracken M.B., Shepard M.J., Holford T.R., et al.//*JAMA.* - 1997. - V.277, №20. - P.1597-1604.
- Bracken M.B. Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence//*Spine (Phila Pa 1976).* - 2001. - V.26, 24 Suppl. - S47-54.
- Cai L.L. Plasticity of functional connectivity in the adult spinal cord/ Cai L.L., Courtine G., Fong A.J., Burdick J.W., et al.// *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.Sci.* - 2006. - V.361, №1473. - P. 1635-1646.
- Darlot F. Extensive respiratory plasticity after cervical spinal cord injury in rats: axonal sprouting and rerouting of ventrolateral bulbospinal pathways/ Darlot F., Cayetanot F., Gauthier P., Matarazzo V., Kastner A.//*Exp. Neurol.* - 2012. - V.236. - P.88-102.
- Edgerton V.R. Training locomotor networks/ Edgerton V.R., Courtine G., Gerasimenko Y.P., Lavrov I., et al.//*Brain. Res. Rev.* - 2008. - V.57, №1. - P. 241-254.
- Falavigna A. Worldwide Steroid Prescription for Acute Spinal Cord Injury/ Falavigna A., Quadros F.W., Teles A.R., Wong C.C., Barbagallo G., Brodke D., Al-Mutair A., Riew K.D. // *Global Spine J.* - 2018 - Vol. 8, №3. - P. 303-310.
- Fehlings M.G. Efficacy and Safety of Methylprednisolone Sodium Succinate in Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review/ Fehlings M.G., Wilson J.R., Harrop J.S., Kwon B.K., Tetreault L.A., Arnold P.M., Singh J.M., Hawryluk G., Dettori J.R.//*Global Spine J.* - 2017. - V.7 (3 Suppl). - P. 1165-1375.
- Galandiuk S. The two-edged sword of large-dose steroids for spinal cord trauma/ Galandiuk S., Raque G., Appel S., Polk H.C. Jr. // *Ann. Surg.* - 1993. - V. 218, №4. - P. 419-427.
- Iafarova G.G. Effect of Local Hypothermia on H₁ and M₁ Responses after Spinal Cord Contusion in Dogs/ Iafarova G. G., Tumakaev R. F., Hazieva A. R., and Baltina T. V.// *Biophysics.* - 2014. - V. 59, № 5. - P. 829-833.
- Raineteau O. Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat/ Raineteau O., Fouad K., Noth P., Thallmair M., Schwab M. E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* - 2001. - V. 98, №12. - P. 6929-6934.
- Torres S. Early metabolic reactivation versus antioxidant therapy after a traumatic spinal cord injury in adult rats/ Torres S., Salgado-Ceballos H., Torres J.L., Orozco-Suarez S. et al.//*Neuropathology.* - 2010. - V.30, №1. - P.36-43.
- Weaver L.C. Methylprednisolone causes minimal improvement after spinal cord injury in rats, contrasting with benefits of an anti-integrin treatment/ Weaver L.C., Gris D., Saville L.R., Oatway M.A., Chen Y., Marsh D.R., Hamilton E.F., Dekaban G.A.// *J. Neurotrauma.* - 2005. - V. 22, №12. - P. 1375-1387.

17. Weishaupt N. Synergistic effects of BDNF and rehabilitative training on recovery after cervical spinal cord injury/ Weishaupt N., Li S, Di Pardo A., Sipione S., Fouad K.//Behav. Brain Res. – 2013. – V. 239, №2. – P. 31–42.
18. Zhang Z. An expert consensus on the evaluation and treatment of acute thoracolumbar spine and spinal cord injury in China/ Zhang Z., Li F., Sun T.// Neural. Regen. Res. – 2013. – V. 8, №33. – P. 3077–3086.
19. Zhou X. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury / Zhou X., He X., Ren Y.// Neural. Regen Res. – 2014. – V.9, №20. – P.1787–1795.