

УДК 616.832: 599.323.3

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЯ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В ИШЕМИЗИРОВАННОМ СПИННОМ МОЗГЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА И ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

А. М. Володченко, Р. У. Гиниатуллин, А. И. Козель, Л. В. Астахова*

*Челябинский государственный институт лазерной хирургии,
г. Челябинск, Российская Федерация*

DYNAMICS OF MICROCIRCULATION INDEX CHANGES IN ISCHEMIC SPINAL MARROW EXPOSED TO RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN AND LASER EMISSION (EXPERIMENTAL STUDY)

A. M. Volodrenko, R. U. Giniatullin, A. I. Kozel, L. V. Astakhova*

Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery, Chelyabinsk, Russian Federation

Цель. Исследование динамики показателя микроциркуляции в очаге экспериментальной ишемии спинного мозга у крыс под воздействием рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения.

Материалы и методы. Работа выполнена на 80 половозрелых крысах. Проведены 4 серии опытов по 20 животных. У животных, участвовавших в опытах первой серии (контрольная группа), моделировали ишемию спинного мозга. Во второй серии животным через 3, 24 и 48 ч вводили внутривенно 1000 МЕ рекомбинантного эритропоэтина. В опытах 3-й серии после операции животным проводили накожное облучение области ишемии диодным лазером. В 4-й серии опытов проводилось лазерное облучение ишемического очага в сочетании с введением рекомбинантного эритропоэтина. У всех животных и на каждом сроке эксперимента проводилась оценка показателя микроциркуляции с использованием прибора ЛАКК-01 (Россия) с последующей математической и статистической обработкой с помощью комплекта программ ООО «Лазма» (Россия).

Результаты. Достоверно показано что, рекомбинантный эритропоэтин обладает антиапоптотическим и антигипоксическим действием, стимулирует ангио- и нейрогенез, а воздействие лазерного излучения инфракрасного диапазона способствует усилению микроциркуляции в очаге ишемии.

Выводы. Показано, что сочетанное воздействие рекомбинантного эритропоэтина и лазерного излучения в зоне ишемического повреждения спинного мозга значительно увеличивает местный кровоток. Это сопровождается ранним регрессом неврологических расстройств, активизацией поведения животных.

Ключевые слова. Спинной мозг, ишемия, рекомбинантный эритропоэтин, лазерное излучение, показатель микроциркуляции.

© Володченко А. М., Гиниатуллин Р. У., Козель А. И., Астахова Л. В.

e-mail: volodchenko174@yandex.ru

тел: 8 (351) 749 97 46

[Володченко А. М. (*контактное лицо) – врач-нейрохирург нейрохирургического отделения № 2; Гиниатуллин Р. У. – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научно-исследовательской работе; Козель А. И. – доктор медицинских наук, профессор, директор; Астахова Л. В. – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела фундаментальных исследований].

Aim. To study the dynamics of microcirculation index in the focus of experimental spinal marrow ischemia in rats exposed to recombinant erythropoietin and laser emission.

Materials and methods. The work was carried out on 80 sexually mature rats, divided into four test series – 20 animals each. In animals of series one, the control group, the spinal marrow ischemia was modeled. In series two, animals were intraperitoneally introduced 1000 ME of recombinant erythropoietin in 3, 24 and 48 hours. Animals of series three after the operation were exposed to skin irradiation with diode laser in the zone of ischemia. In test series four, laser emission of the ischemic focus was combined with introduction of recombinant erythropoietin. Assessment of microcirculation index was performed in animals of all the series during each period of the test using the unit LAKK-01 (Russian Federation) with subsequent mathematical and statistical processing by means of the program “Lasma” (Russian Federation).

Results. The study results reliably indicate that recombinant erythropoietin possesses an antiapoptotic and antihypoxic effect, stimulates angio- and neurogenesis, but when exposed to laser emission of infrared range it promotes strengthening of microcirculation in the focus of ischemia.

Conclusions. Combined effect of recombinant erythropoietin and laser emission in the zone of ischemic lesion of the spinal marrow significantly raises the local blood flow. It is accompanied by an early regress of neurological disorders and activation of behavior in animals.

Key words. Spinal marrow, ischemia, recombinant erythropoietin, laser emission, microcirculation index.

ВВЕДЕНИЕ

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

Основополагающим моментом в лечении данной патологии является улучшение местного кровообращения за счет включения коллатералей и увеличения объемной скорости кровотока. Рядом авторов показано, что развитие некроза в зоне ишемии спинного мозга можно избежать с помощью реперфузии и применения нейропротективных препаратов, в частности под воздействием альфа-GPC, церебролизина, пироцетама, винпоцетина [3]. В то же время эффективность нейромедиаторной терапии ишемических повреждений ЦНС после введения указанных препаратов является различной и остается невысокой, что диктует необходимость поиска новых методов лечения данной патологии.

Требуются новые подходы и методы лечения цереброваскулярной патологии. Одним из современных направлений таких исследований является изучение возможности применения в клинической практике

препаратов с нейропротекторной активностью. В связи с этим в последние годы большой интерес вызывает рекомбинантный эритропоэтин (РЭП), плейотропные эффекты которого являются объектом пристального внимания исследователей различных специальностей. В частности, установлены нейропротекторные свойства РЭП, связанные с антиапоптотическим и антигипоксическим действиями [5–8].

Наряду с этим одним из наиболее главных эффектов лазерного излучения, доказанных как в экспериментальных исследованиях, так и в условиях клиники, является его способность стимулировать регенераторные и репаративные процессы в тканях. Одним из ключевых моментов в регенерации тканей является стимуляция ангиогенеза в поврежденной ткани [1].

Поэтому выяснение возможной патогенетической роли РЭП и лазерного излучения в коррекции ишемических нарушений в спинном мозге представляется весьма перспективным и актуальным исследованием.

Цель исследования – оценка показателя микроциркуляции в очаге экспериментальной ишемии спинного мозга у крыс под воздействием РЭП и лазерного излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведен эксперимент на 80 беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 220–250 г. Животные содержались в условиях вивария, регламентируемых приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 г. Опыты проводили в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.09.1977 г. и № 701 от 27.07.1978 г. об обеспечении принципов гуманного обращения с животными. Все оперативные вмешательства проводились в экспериментальной операционной с соблюдением правил асептики и антисептики под внутримышечным обезболиванием золитилом (2 мг/кг массы тела животного). Выведение животных из эксперимента осуществлялось путем внутрисердечного введения 3 мл 7,5%-ного раствора хлористого калия. Проведено 4 серии опытов.

В первой серии экспериментов на 20 животных (группа сравнения) моделировали ишемию спинного мозга по методике, предложенной Г. З. Суфиановой и др. [4]. Транзиторную ишемию поясничного отдела спинного мозга создавали путем тотальной интравазальной окклюзии с последующим клипированием бедренных артерий. 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 эксперимента на 3, 7, 14, 30-е сутки после операции. На каждом сроке наблюдения исследовано 5 крыс.

Во второй серии эксперимента на 20 животных моделировали ишемию спинного мозга по методике, описанной выше (1-я серия эксперимента). Через 3 ч после операции каждому животному вводили внутривентрикулярно 1000 МЕ РЭП («Эпокрин 2000 МЕ») из расчета 5000 МЕ на 1 кг массы тела жи-

вотного по международному протоколу. 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 сутки после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 5 крыс.

В третьей серии экспериментов на 20 животных моделировали ишемию спинного мозга, через 2 ч после операции проводили дистанционное накожное (4 см от поверхности кожи), в непрерывном режиме облучение области ишемического очага диодным лазером «ALTO» с длиной волны 980 нм, используя обоснованные морфологически параметры: мощность – 2 Вт, экспозиция – 3 мин. Доставка лазерного излучения к объекту осуществлялась с помощью головки излучателя. Животных выводили из опыта на 3, 7, 14, 30-е сутки после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 5 крыс.

В четвертой серии эксперимента на 20 животных с моделированной ишемией спинного мозга через 2 ч после операции проводили накожное облучение диодным лазером с помощью отработанных параметров (третья серия эксперимента). Затем через 3 ч вводили внутривентрикулярно трехкратно РЭП в соответствии с международным протоколом (вторая серия эксперимента). Таким образом, осуществлялось лазерное облучение операционной раны в сочетании с внутривентрикулярным введением РЭП. Выведение животных из опыта осуществляли на 3, 7, 14, 30-е сутки после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 5 крыс.

МЕТОДИКА ДОПЛЕРОВСКОЙ ЛАЗЕРНОЙ ФЛУОМЕТРИИ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В ТКАНЯХ СПИННОГО МОЗГА

У всех животных и на каждом сроке эксперимента проводилась оценка поведенческих реакций, а также показателя микро-

циркуляции (ПМ) с использованием прибора «ЛАКК-01» (Россия) на основе инфракрасного лазера с помощью трехканального светового зонда, смонтированного из кварцевых моноволоконных световодов. Показатели у анестезированных золотилом животных снимались датчиком, приложенным непосредственно к коже спины в области поясничного отдела позвоночника, в указанные выше сроки до выведения животных из опытов. Время записи ЛДФ-граммы составляло 60 с. Определялся ПМ, который является функцией от средней скорости эритроцитов (V_{cp}) и концентрации эритроцитов в зондируемом объеме тканей ($N_{эп}$), зависящей от показателя гематокрита и количества функционирующих сосудов:

$$ПМ = N_{эп} \cdot V_{cp}$$

Величина ПМ измерялась в относительных перфузионных единицах (пер. ед.).

Математическая и статистическая обработка показателей прибора осуществлялась с помощью комплекта программ ООО «Лазма» (Россия) и с использованием непараметрического U -теста Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали (таблица), что ПМ у крыс, участвующих в 1-й серии опытов, был значительно ниже

контрольной группы на всех сроках эксперимента. У животных 2-й серии ПМ был достоверно выше на 3-и и 7-е сутки по сравнению с контрольной группой, а на остальных сроках не отличался. В то же время ПМ 2-й серии был существенно больше по сравнению с 1-й серией на всех сроках наблюдения, ПМ в 3-й серии был достоверно выше, чем в 1-й серии, на всех сроках, но ниже на 3-и и 7-е сутки по сравнению со 2-й серией. В 4-й серии ПМ на 3-и, 7-е и 14-е сутки был значительно выше по сравнению с контрольной группой, а на всех сроках выше по отношению к 1-й серии. Наряду этим, ПМ в 4-й серии был достоверно больше на 3-и и 7-е сутки по сравнению со 2-й серией, а на 3-и, 7-е и 14-е сутки выше по сравнению с 3-й серией эксперимента.

Данные изменения сопровождались более ранним регрессом неврологических расстройств, активизацией поведения животных.

Полученные результаты можно объяснить, вероятно, тем, что РЭП обладает антиапоптоическим и антигипоксическим действием, стимулирует ангио- и нейрогенез [2–8], а воздействие лазерного излучения инфракрасного диапазона, глубоко проникающего в ткани, способствует усилению микроциркуляции, повышению функциональной активности различных клеток, включая эндотелиоциты сосудов, что приводит к активации неангиогенеза в облачаемых тканях [1].

Динамика показателя микроциркуляции в тканях спинного мозга крыс различных серий опытов ($M \pm m$; пер. ед.)

Серия опыта	Сроки наблюдения (сутки)			
	3-и	7-е	14-е	30-е
1. Модель ишемии спинного мозга	2,1 ± 0,3*	2,3 ± 0,3*	2,5 ± 0,2*	3,1 ± 0,2*
2. Лечение ишемии спинного мозга РЭП	6,2 ± 0,4**	5,7 ± 0,4**	5,3 ± 0,3**	4,4 ± 0,4**
3. Лечение ишемии лазерным излучением	4,1 ± 0,2**#	4,2 ± 0,2**#	4,3 ± 0,3**	4,4 ± 0,5**
4. Лечение ишемии спинного мозга РЭП в сочетании с лазерным излучением	7,5 ± 0,5***#▲	6,9 ± 0,4***#▲	5,6 ± 0,4***#▲	4,5 ± 0,3**
5. Контроль	4,3 ± 0,5			

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; ** – $p < 0,05$ по сравнению с 1-й серией опыта; # – $p < 0,05$ по сравнению со 2-й серией опыта; ▲ – $p < 0,05$ по сравнению с 3-й серией опытов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что применение лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона в сочетании с РЭП способствует достоверному увеличению показателя микроциркуляции в зоне ишемического повреждения спинного мозга. Таким образом, происходит усиление местного кровотока, уменьшается объем зоны необратимого ишемического повреждения, что сопровождается в динамике наблюдения более ранним регрессом неврологических расстройств, восстановлением поведенческих реакций у животных [2].

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Головнева Е. С. О роли тучных клеток в стимуляции процесса неангиогенеза в ответ на воздействие высокоинтенсивного лазерного излучения. *Лазерная медицина* 2001; 5: 29–32.
2. Козель А. И., Попов Г. К., Гиниятуллин Р. У., Астахова Л. В., Володченко А. М. Способ лечения ишемии спинного мозга в эксперименте. Патент РФ на изобретение № 2496513 от 20.10.2013 г.
3. Онищенко Л. С., Гайкова О. Н., Янишевский С. Н. Изменения в очаге экспериментального ишемического инсульта под воздействием нейротропных препаратов. *Морфология* 2006; 6: 40–46.
4. Суфьянова Г. З., Усов Л. А., Суфьянов А. А. Новая малоинвазивная модель ишемии спинного мозга у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2002; 133 (1): 116–120.
5. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konak S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagioglu E, Cerami A, Brines M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 2258–2263.
6. Santhanam A.V., Katusic Z. S. Erythropoietin and cerebral vascular protection: role of nitric oxide. *Acta Pharmacol. Sin.* 2006; 27: 1389–1394.
7. Siren A. L., Fratelli M., Brines M., Goemans C., Casagrande S., Lewczuk P., Keenan S., Gleiter C., Pasquali C., Capobianco A., Mennini T., Heumann R., Cerami A., Ehrenreich H., Ghezzi P. Erythropoietin prevent neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 4044–4049.
8. 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; 35: 1732–1737.

Материал поступил в редакцию 16.10.2014