

© Коллектив авторов, 2015

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНОГО ПО ОБЪЕМУ ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ УТРАЧЕННЫХ ФУНКЦИЙ (ЧАСТЬ 2)

С.П. Миронов, С.В. Колесов, Г.А. Степанов, М.Л. Сажнев, С.П. Губин,
Ю.В. Иони, В.Г. Мотин, А.А. Пантелеев

ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова» РАН, Москва, РФ

Цель исследования заключалась в отработке методики регистрации вызванных соматосенсорных потенциалов в условиях повреждения проводящих путей спинного мозга в эксперименте. Регистрацию вызванных потенциалов осуществляли у лабораторных животных, разделенных на 5 групп в зависимости от объема повреждения, наносимого по ранее отработанной методике. Потенциалы регистрировали до операции, на 1, 7, 14, 21, 30 и 45-е сутки после операции. В 1-е сутки в группах с неполным пересечением спинного мозга отмечалось резкое снижение амплитуды потенциалов, в группах с полным пересечением спинного мозга потенциалы не регистрировались. В динамике наблюдения констатировали незначительное восстановление проводимости только у крыс в группе с 50% пересечением спинного мозга. Результаты исследования продемонстрировали эффективность методики при оценке проводимости спинного мозга, а также подтвердили отсутствие спонтанного восстановления проводимости после пересечения более 50% спинного мозга.

Ключевые слова: вызванные потенциалы, проводимость, спинной мозг, эксперимент, проводимость нервных путей.

Modeling of a Different Volume Spinal Cord Injury in Rats and Methods for Evaluation of Lost Functions Restoration (part 2)

S.P. Mironov, S.V. Kolesov, G.A. Stepanov, M.L. Sazhnev, S.P. Gubin,
Yu.V. Ioni, V.G. Motin, A.A. Panteleev

Central Institute of Traumatology and Orthopaedics named after N.N. Priorov;
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia

The purpose of the study was to work out the methods for somatosensory evoked potentials registration under conditions of nerve paths injury in experiment. Evoked potentials were recorded in laboratory animals divided into 5 groups according to the volume of injury inflicted by the technique worked through previously. Potentials were recorded prior to intervention and on 1st, 7th, 14th, 21st, 30th and 45th postoperative day. On the 1st day sharp decrease of potential amplitudes was observed in groups with incomplete spinal cord injury. In groups with complete spinal cord injury no potentials were recorded. Slight restoration of nerve conductivity was observed only in rats with 50% spinal cord transection. Study results showed the efficacy of the technique in the assessment of spinal cord tissues conductivity and confirmed the absence of spontaneous nerve paths restoration after more than 50% of spinal cord transection.

Key words: evoked potentials, conductivity, spinal cord, experiment, nerve paths.

Введение. Электрофизиологические методы исследования незаменимы не только при оценке нарушений проводимости нервных путей, вызванных повреждением спинного мозга, но и при оценке степени ее последующего восстановления. В настоящее время в изучении последствий травм спинного мозга широко применяются модели повреждения на лабораторных животных, в основном на крысах и мышах. Ввиду доступности, знания генетических и биохимических характеристик, эти модели удобны для изучения молекулярных механизмов вторичного повреждения и восстановления после травмы спинного мозга. Также они позволя-

ют с достаточно большой точностью моделировать повреждение различной выраженности и локализации [1–3].

Для определения степени нарушения и восстановления неврологических функций применяются методы поведенческой оценки. Однако поведенческие признаки в большинстве случаев отражают комплексные процессы сенсомоторной интеграции и не позволяют с большой степенью уверенности дифференцировать нарушение целостности чувствительных и двигательных путей [4]. При повреждении спинного мозга в грудном отделе у грызунов нарушается координация движений, и, в за-

висимости от выраженности повреждения, снижается или полностью выпадает моторная функция задних конечностей. Проведение электрофизиологического исследования необходимо для объективной оценки функциональной целостности проводящих путей спинного мозга после его повреждения. Однако в связи с небольшими размерами экспериментальных животных электрическая стимуляция и регистрация ответных импульсов представляет определенные трудности.

Среди множества способов фиксирования электрической активности ЦНС регистрация вызванных потенциалов (ВП) представляет одну из наиболее эффективных методик исследования функций ЦНС. В отличие от ЭЭГ или ЭМГ, посредством которых измеряется спонтанная электрическая активность нейронов, применение методики ВП обеспечивает значительно больший контроль над параметрами исследования, так как дает возможность регистрировать нейрональную активность, являющуюся прямым ответом на воздействие внешнего электрического стимула. Ответные нервные импульсы могут быть отслежены на любом уровне, включая периферические чувствительные импульсы, центральную нервную активность и ответные двигательные импульсы. Возникший в результате стимуляции отдельного периферического нерва импульс может быть зарегистрирован в любой точке по всей длине нерва или спинальных соматосенсорных проводящих путей, в том числе в субкортикальных и кортикальных структурах [2].

Вызванный потенциал представляет собой местное изменение электрического поля нервной структуры, которое следует за воздействием внешнего стимула. Так как амплитуда ВП сравнима с амплитудой спонтанной активности нейронов, он может «теряться» среди этих фоновых электрических изменений. В связи с этим возникают проблемы с регистрацией конкретного потенциала в физиологических условиях. Необходимый сигнал должен быть выделен из фонового шума. Наиболее часто в этих целях применяется методика «усреднения». Так как при спонтанной активности регистрируются практически беспорядочные положительные и отрицательные значения, при суммации их среднее значение стремится к нулю. Таким образом, при условии, что стимул не влияет на спонтанную электрическую активность, суммация сигналов приводит к устранению фонового шума [5, 6].

В 1947 г. Dawson впервые успешно выделил ВП на фоне спонтанной электроэнцефалографической активности путем наложения фотографий последовательных записей ЭЭГ. В результате этого ему удалось изолировать ответ на единичный электрический стимул и минимизировать шумовые потенциалы электрической активности мозга, не связанной с вызванным потенциалом [7]. Позднее была использована методика электронной суммации сигналов [8]. С появлением компьютерной техники,

начиная с работ Clark, регистрацию ВП осуществляли с помощью различных методик цифрового усреднения [3]. В 1970 г. Jewett использовал методику регистрации потенциалов головного мозга в ответ на слуховой стимул с помощью усреднения, что дало начало целому ряду исследований электрической активности ЦНС при помощи ВП [9].

В зависимости от природы и механизма внешнего электрического воздействия выделяют две группы ВП — сенсорные и моторные. Сенсорные ВП вызываются путем стимуляции афферентных путей и включают соматосенсорные, визуальные и слуховые. Моторные ВП получают в результате воздействия на эфферентные пути на разных уровнях. Обычно проводится стимуляция моторной области коры головного мозга или шейного отдела спинного мозга. При этом регистрацию осуществляют с нижележащих отделов спинного мозга, периферических нервов или мышц-мишеней. Сенсорные ВП в свою очередь можно разделить на коротколатентные (<10 мс), среднелатентные (10–50 мс) и длиннотатентные (>50 мс). Коротколатентные ВП обычно достаточно устойчивые и мало подвержены влиянию состояния исследуемого животного и анестезии. Среднелатентные ВП отражают переход между состоянием сна и бодрствования и в большей мере подвержены влиянию анестезии. Длиннотатентные ВП в наибольшей степени зависят от анестезии и активности ЦНС [10]. Моторные ВП обычно регистрируют электродами, установленными в мышцах или в непосредственной близости от спинного мозга. Наиболее часто их используют с диагностической целью для оценки целостности центральных двигательных путей [1, 11].

Нейрофизиология спинного мозга может быть изучена при помощи ВП практически на любом его уровне, включая периферические афферентные пути, интраспинальные пути, субкортикальные и кортикальные структуры.

Функциональное состояние спинного мозга может быть исследовано путем применения как соматосенсорных, так и моторных ВП. Существует множество методик регистрации ВП. Различаются они в основном видом используемых электродов и расположением стимулирующего и регистрирующего электродов. Электроды классифицируются в зависимости от необходимости их имплантации. Выделяют нехирургические и хирургические электроды. Нехирургические включают клипсы или диски, которые крепятся к поверхности кожи, игольчатые электроды, которые вводятся подкожно или чрескожно между позвонков. Хирургические электроды включают электроды, имплантируемые в кость, проволочные электроды, имплантируемые в периферические нервы, жесткие и гибкие эпидуральные электроды и капиллярные игольчатые электроды для интраспинального и интраганглиарного воздействия [12, 13].

В зависимости от расположения электродов функциональное состояние спинного мозга можно

отслеживать вдоль всего спинального канала или в области черепа. Все эти области могут использоваться как для стимуляции, так и для регистрации ВП. Регистрация потенциалов вдоль спинного мозга дает подробную информацию о конкретных структурах и функциях этого органа. Регистрация стандартного соматосенсорного ВП (ССВП) отображает волны, соответствующие пресинаптическим компонентам, постсинаптическим интернейронным компонентам и постсинаптическим ответам моторных нейронов. Изменения в соответствующих волновых параметрах могут указывать на уровень повреждения конкретной функциональной единицы спинного мозга [1, 11, 13].

Цель исследования: отработка методики регистрации вызванных соматосенсорных потенциалов в условиях повреждения проводящих путей спинного мозга в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 100 лабораторных животных — самках крыс породы Вистар массой 220–260 г. Эксперимент осуществляли в соответствии с «Рекомендациями комитета по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований» (ВОЗ, 2000) и «Директивами Европейского сообщества» (86-609 ЕЕС). Животные были разделены на 5 групп по 20 крыс в зависимости от объема повреждения: 1-я группа — пересечение 50% спинного мозга; 2-я группа — 80–90% спинного мозга; 3-я группа — полное пересечение спинного мозга (плотный контакт поврежденных концов спинного мозга); 4-я группа — резекция сегмента спинного мозга длиной 1 см; 5-я группа — полное пересечение спинного мозга с отсутствием контакта в зоне повреждения (концы спинного мозга в зоне повреждения разведены).

Все операции осуществлялись одной хирургической бригадой с использованием оптического микроскопа Carl Zeiss и микрохирургического инструментария по методике, описанной ранее [14]. Ведение животных в раннем послеоперационном периоде осуществляли в условиях, способствовавших наиболее эффективному восстановлению животных [14].

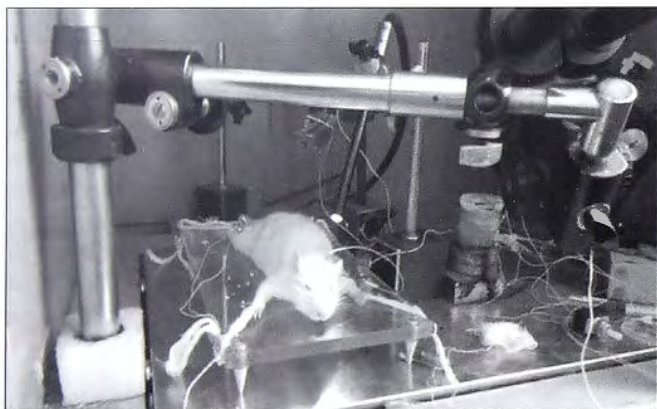


Рис. 1. Положение животного при регистрации ССВП.

Регистрирующий игольчатый электрод устанавливали в череп животного в область проекции сенсомоторной коры, а стимулирующий — в область мышц сгибателей бедра (рис. 1). Стимуляцию проводили при помощи изолированного стимулятора постоянным током со следующими параметрами: 3 мА, продолжительность стимула 20 мс, частота 0,5 Гц.

Обработку данных и статистический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения MATLAB и StatSoft STATISTICA 8.0. Для определения статистической значимости различий в независимых группах для множественного сравнения использовали тест Краскела — Уоллиса, для попарного сравнения групп — *U*-тест Манна — Уитни с поправкой Бонферони. Критический уровень значимости при статистической проверке гипотез был принят равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Соматосенсорные вызванные потенциалы изменялись у всех животных до операции для получения исходных значений амплитуды и межпиковой латентности. В 1-е сутки после операции регистрируемые ССВП демонстрировали значительное снижение амплитуды и увеличение межпиковой латентности, что говорит о количественном снижении проводимости сигналов и снижении скорости передачи сигнала в области повреждения (рис. 2). В группе с 50% пересечением спинного мозга амплитуда регистрируемого в 1-е сутки после операции потенциала снизилась на $87,8 \pm 5,5\%$ ($p < 0,05$; см. рис. 2, а), в то время как межпиковая латентность увеличилась почти в 2 раза. При пересечении 80% спинного мозга пики ССВП практически не регистрировались: амплитуда ССВП была снижена на $95,2 \pm 3,2\%$ ($p < 0,05$; см. рис. 2, б). В случаях полного пересечения и разведения концов спинного мозга, а также при его резекции с диастазом концов в 1 см проводимость тканей спинного мозга была полностью нарушена (см. рис. 2, в).

При анализе динамики проводимости спинного мозга лабораторных животных в течение 45 дней после его пересечения было выявлено, что незначительное спонтанное восстановление проводимости имело место только в группе с 50% пересечением (рис. 3, а). Средние показатели амплитуды ССВП в 1-е сутки после операции составляли $9,1 \pm 2,6\%$ ($p < 0,05$) от исходной амплитуды (в среднем 45 ± 10 мкВ). Через неделю наблюдалось увеличение амплитуды до $13,5 \pm 2,7\%$ ($p < 0,05$). Через 2 нед после пересечения амплитуда увеличивалась в среднем до $16,4 \pm 1,5\%$ ($p < 0,05$). В последующем статистически значимого увеличения амплитуды не наблюдалось. Также в 1-е сутки в среднем на $87 \pm 15,5\%$ ($p < 0,05$) увеличивалась межпиковая латентность (исходная латентность в этой группе в среднем составила $23,5 \pm 5,9$ мс). Однако в последующем статистически значимых изменений межпиковой латентности не наблюдалось.

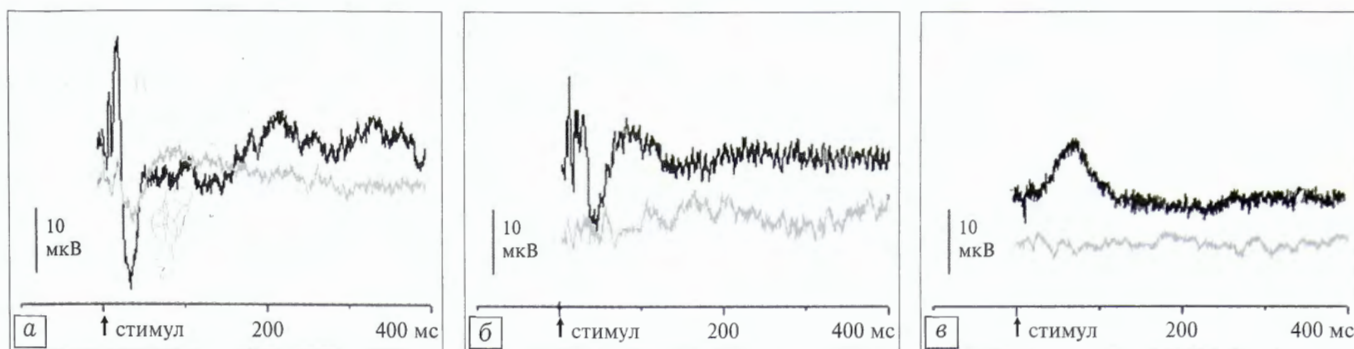


Рис. 2. Репрезентативные кривые ССВП в ответ на стимуляцию мышц задней лапы при пересечении 50% (а), 80% (б) и 100% (в) спинного мозга. Объяснения в тексте. Черная кривая — контроль, светлая — опыт.

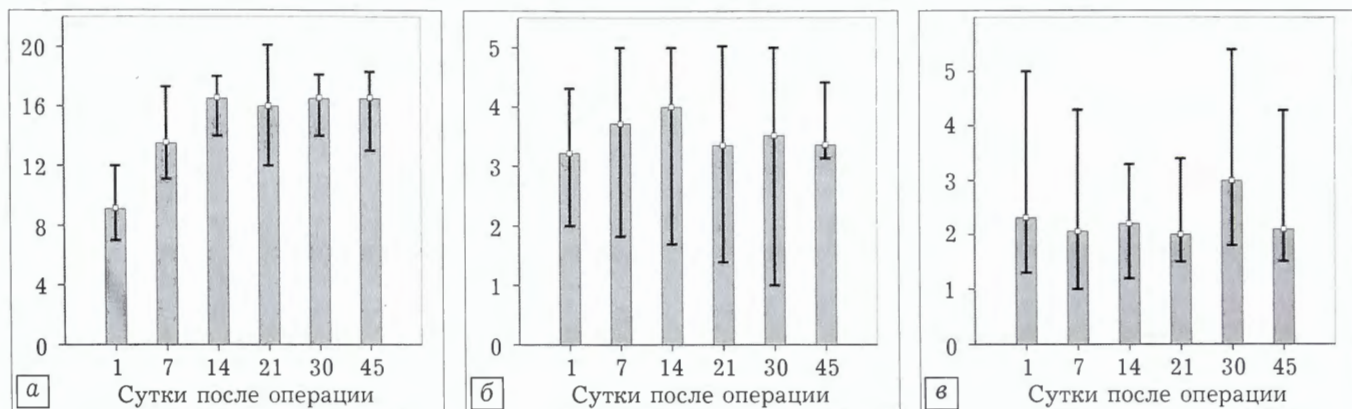


Рис. 3. Амплитуда ССВП (в % от исходной) при пересечении 50% (а), 80% (б) и 100% (в) спинного мозга. Объяснения в тексте.

При пересечении спинного мозга на 80% (рис. 3, б) в 1-е сутки амплитуда ССВП снижалась до $3,2 \pm 1,5\%$ от исходной ($38 \pm 5,7$ мкВ). В последующем статистически значимых изменений амплитуды не наблюдалось. Определить значения межпиковой латентности в большинстве случаев не представлялось возможным.

При полном пересечении спинного мозга ССВП практически не регистрировались (рис. 3, в). При полном пересечении и разведении концов спинного мозга, а также при его резекции проводимость спинного мозга полностью нарушалась.

ОБСУЖДЕНИЕ

Применение методики регистрации ССВП позволяет достоверно и точно оценить состояние проводящих путей спинного мозга при высокой воспроизводимости экспериментальных данных. Методика хорошо зарекомендовала себя в научном сообществе и широко применяется в работах по изучению физиологии ЦНС наряду с механофункциональными и визуальными способами оценки ее функционального состояния [4, 11].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, подтверждают эффективность методики регистрации ВП при оценке степени проводимости структур ЦНС. Несмотря на ее трудоемкость и необходимость в специальном лабораторном и электронейрофизиологическом оборудовании, она дает возможность объективно оценить тяжесть повреждения тканей спинного мозга, а также степень и

скорость их восстановления. В ходе работы была продемонстрирована корреляция между объемом повреждения и степенью проводимости спинного мозга, подтверждены данные литературы о практически полном отсутствии спонтанной регенерации тканей спинного мозга в долгосрочном периоде при его механическом повреждении. При этом при неполном пересечении спинного мозга все же наблюдалось некоторое количественное восстановление проводимости его тканей, что может быть связано с пластичностью ЦНС или с локальными трофическими изменениями, сопровождающими уменьшение последствий воспалительной реакции в позднем послеоперационном периоде. Отсутствие или крайне низкая эффективность регенеративных процессов в тканях ЦНС также подтверждаются описанным в данном исследовании отсутствием положительной электрофизиологической динамики при полном пересечении и резекции участка спинного мозга в позднем послеоперационном периоде.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-15-00880 «Разработка новых методов лечения поврежденных спинного мозга с использованием магнитных наночастиц в различных средах в сочетании с электромагнитным полем»

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Гнездицкий В.В., Коптелов Ю.М., Архипова Н.А. Частотная структура вызванных потенциалов мозга и их интерпретация. Биофизика. 1980; 25: 958-65 [Gnezditskiy V.V., Koptelov Yu.M., Arkhipova N.A.

- Frequency structure of brain evoked potentials and their interpretation. *Biofizika*. 1980; 25: 958-65 (in Russian)].
2. Гутман А.М. Биофизика внеклеточных полей мозга. М.: Наука; 1980 [Gutman A.M. Biophysics of extracellular brain fields. Moscow: Nauka; 1980 (in Russian)].
 3. Clark W.A. The average response computer (ARC): a digital device for computing averages and amplitude and time histograms of electrophysiological response. *Ire Trans Biomed Electron. BME-8*. 1961; 46-51.
 4. Onifer S.M., Rabchevsky A.G., Scheff S.W. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR J*. 2007; 48 (4): 385-95.
 5. Shibasaki H., Motomura S. Periodic synchronous discharge and myoclonus in Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic application of jerk-locked averaging method. *Ann. Neurol*. 1981; 9 (2): 150-6.
 6. Sgro J.A., Emerson R.G. Phase synchronized triggering: a method for coherent noise elimination in evoked potential recording. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol*. 1985; 60 (5): 464-8.
 7. Dawson G.D. Cerebral responses to electrical stimulation of peripheral nerve in man. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1947; 10 (3): 134-40.
 8. Dawson G.D. A summation technique for detecting small signals in a large irregular background. *J. Physiol*. 1951; 115 (1): 2-3.
 9. Jewett D.L. Volume-conducted potentials in response to auditory stimuli as detected by averaging in the cat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol*. 1970; 28 (6): 609-18.
 10. Legatt A.D., Arezzo J.C. The anatomic and physiologic bases of brain stem auditory evoked potentials. *Neurol. Clin*. 1988; 6 (4): 681-704.
 11. Kawaguchi M., Furuya H. Intraoperative spinal cord monitoring of motor function with myogenic motor evoked potentials: a consideration in anesthesia. *J. Anesth*. 2004; 18: 18-28.
 12. Fehlings M.G., Tator C.H. Motor and somatosensory evoked potentials recorded from the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol*. 1988; 69: 65-78.
 13. Stienen P.J., Haberham Z.L. Evaluation of methods for eliciting somatosensory-evoked potentials in the awake, freely moving rat. *J. Neurosci. Methods*. 2003; 126 (1): 79-90.
 14. Миронов С.П., Колесов С.В., Степанов Г.А., Сажнев М.Л., Губин С.П., Иони Ю.В. Мотин В.Г., Пантелеев А.А. Моделирование различного по объему повреждения спинного мозга крысы и методы оценки восстановления утраченных функций (часть 1). *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. 2015; 3: 73-7 [Mironov S.P., Kolesov S.V., Stepanov G.A., Sazhnev M.L., Gubin S.P., Ioni Yu.V., Motin V.G., Panteleev A.A. Modeling of a Different Volume Spinal Cord Injury in Rats and Methods for Evaluation of Lost Functions Restoration (part 1). *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova*. 2015; 3: 73-7].

Сведения об авторах: Миронов С.П. — доктор мед. наук, профессор, академик РАН и РАМН, директор ЦИТО; Колесов С.В. — доктор мед. наук, профессор, зав. отделением патологии позвоночника ЦИТО; Степанов Г.А. — доктор мед. наук, профессор, науч. сотр. ЦИТО; Сажнев М.Л. — канд. мед. наук, врач отделения патологии позвоночника ЦИТО; Губин С.П. — доктор мед. наук, профессор, зав. лабораторией химии наноматериалов ИОНХ РАН; Иони Ю.В. — канд. мед. наук, науч. сотр. лаборатории химии наноматериалов ИОНХ РАН; Мотин В.Г. — доктор мед. наук, старший науч. сотр. группы экспериментальной травматологии и ортопедии ЦИТО; Пантелеев А.А. — ординатор ЦИТО.

Для контактов: Сажнев Максим Леонидович. 127299, Москва, ул. Приорова, д. 10, ЦИТО. Тел.: 8 (495) 450-44-51, 8 (916) 460-98-78. E-mail: mak.sajnev@yandex.ru.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

При направлении статей в редакцию просим обращать особое внимание на правильность представления иллюстративного материала.

Прилагаемые иллюстрации (фотографии, рисунки, чертежи, диаграммы) по качеству должны быть пригодными для полиграфического воспроизведения. Фотографии должны быть контрастными, рисунки — четкими, чертежи и диаграммы выполняются тушью или печатаются на принтере с высоким разрешением. Дополнительные обозначения (стрелки, буквы и т.п.) даются только на одном экземпляре рисунка. На обороте каждой иллюстрации ставятся номер рисунка, фамилия автора и пометки «верх» и «низ». Фотоотпечатки с рентгенограмм желательно присылать со схемой.

Иллюстрации могут быть представлены в электронной версии — обязательно как отдельные графические файлы (без дополнительных обозначений — стрелок, букв и т.п.): в формате TIFF (разрешение 400 dpi), векторные рисунки — в виде публикации Corel Draw, диаграммы — в виде таблиц данных Excel. Используются следующие типы носителей: CD, DVD, Flash-носители, дискеты 1,44 МВ, возможна доставка материала по электронной почте. При этом обязательно прилагаются распечатанные иллюстрации.

Подписи к рисункам печатаются на отдельном листе с указанием номера рисунка. В тексте обязательно дается ссылка на каждый рисунок. В подписях приводится объяснение значения всех кривых, букв, цифр и других условных обозначений. В подписях к микрофотографиям указывается увеличение (окуляр, объектив) и метод окраски или импрегнации материала.