

ОЦЕНКА НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ДОСТАВКИ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНА В НЕРВНУЮ ТКАНЬ ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА У КРЫС

EVALUATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECTS AT DIFFERENT METHODS OF DELIVERY OF METHYLPREDISOLONE IN NERVOUS TISSUE IN SPINAL CORD INJURY

**T. Baltina
D. Sabirova
M. Baltin**

Summary. In present article it was shown the effectiveness of local delivery of methylprednisolone by combination with a copolymer in comparison with intravenous administration of methylprednisolone in a treatment of spinal cord injury. The contusion spinal cord injury was modeled in rats according to the Allen method. Assessment of the state of the neuromotor apparatus was carried out with the use of electrophysiological methods by evaluating parameters of evoked responses of rat hind limb muscles during epidural spinal cord stimulation. The state of motor activity was estimated according to the BBB scale in an open field test. All experiments were performed in compliance with bioethical norms. It was shown that the complex of methylprednisolone with the polymer changed the excitability of spinal cord neurons and improved the functional recovery of motor functions. It was found that a single administration of methylprednisolone during the first 6 hours after the injury had a neuroprotective effect. It was demonstrated that local delivery of methylprednisolone in combination with a copolymer could minimize side effects associated with a high dose of systemic delivery of methylprednisolone, providing local and prolonged release of methylprednisolone to the damaged spinal cord. Obtained results may be relevant for the development of optimal treatment protocols in experimental and future clinical studies aimed at improving posttraumatic regeneration of the spinal cord.

Keywords: spinal cord injury, rats, electrophysiology, methylprednisolone succinate, copolymer..

Балтина Татьяна Валерьевна

К.б.н., доцент, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет
tvbaltina@gmail.com

Сабирова Диана Эмильевна

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет
sabirova.dianka@list.ru

Балтин Максим Эдуардович

М.н.с., ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет
Baban.bog@mail.ru

Аннотация. В статье показана эффективность локальной доставки метилпреднизолон в комплексе с сополимером после повреждения спинного мозга в сравнении с внутривенным введением препарата. Использовали модель контузионной травмы спинного мозга у крыс по методу Аллена. Оценку состояния нейро-моторного аппарата проводили с использованием электрофизиологических методов по параметрам вызванных ответов мышц задней конечности крысы при эпидуральной стимуляции спинного мозга. Состояние двигательной активности осуществляли с использованием шкалы БББ в тесте открытое поле. Все эксперименты выполнены с соблюдением биоэтических норм. Показано, что комплекс метилпреднизолон с полимером изменяет возбудимость нейронов спинного мозга и улучшает функциональное восстановление двигательных функций. Определено, что однократное введение метилпреднизолон в течение первых 6 часов после травмы оказывает нейропротекторный эффект. Продемонстрировано, что локальная доставка метилпреднизолон в комплексе с сополимером может минимизировать побочные эффекты, связанные с высокой дозой системной доставки метилпреднизолон, обеспечивая локальное и длительное высвобождение метилпреднизолон в поврежденный спинной мозг. Полученные результаты могут иметь значение для разработки оптимальных протоколов лечения в экспериментальных и будущих клинических исследованиях, направленных на улучшение посттравматической регенерации спинного мозга.

Ключевые слова: травма спинного мозга, крысы, электрофизиология, метилпреднизолон сукцинат, сополимер.

Введение

Метилпреднизолон натрия сукцинат (МПС) в настоящее время является единственным нейропротекторным препаратом, обычно используемый в клинике для лечения острой травмы спинного мозга (ТСМ). МПС имеет давнюю историю применения при широком спектре заболеваний, учитывая его сильное противовоспалительное действие. Однако все больше исследований на животных в модельных экспериментах при ТСМ продемонстрировали неоднозначные результаты в отношении нейропротекторной эффективности МПС [1]. Как и у всех глюкокортикоидов, побочные эффекты МПС зависят как от дозы, так и от продолжительности введения, и могут варьировать от изменения внешнего вида (например, отечность) до тех, которые угрожают жизни пациента. Показана возможность развития сопутствующих заболеваний, которые могут усугубляться при лечении МПС [2].

Неионогенные амфифильные полимеры привлекают все большее внимание исследователей, так как способны обратимо изменять конформацию и активность биологических компонентов — липидных мембран, мембранных транспортеров и ферментов [3]. К числу наиболее изученных амфифильных полимеров относятся блоксополимеры этиленоксида и пропиленоксида. Несмотря на достигнутые в этой области успехи, актуальной задачей остается разработка более активных и менее токсичных эффекторов внутриклеточной доставки биологически активных веществ на основе амфифильных полимеров.

Целью настоящего исследования было оценить функциональные изменения спинальных нейронных сетей в остром периоде травмы спинного мозга электрофизиологическими методами при использовании новых биологически активных сополимеров, проявляющих функцию переносчика лекарственных препаратов в центральную нервную систему и нейропротекторное действие.

Материалы и методы исследования

В ходе экспериментов были обследованы нелинейные лабораторные крысы-самки, 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 29.05.2015 г. Все процедуры выполнялись под комбинированным внутримышечным наркозом с использованием золетила («Zoletil 50» «Virbac», Франция), 1 мг/кг и ксилавета инъекци-

онного (XylaVET, «Pharmamagist Ltd», Венгрия) 0,05 мл/кг — 0,10 мл/кг.

Открытая контузионная позвоночно-спинномозговая травма наносилась на уровне позвонка T8 по модифицированной методике A. R. Allen (1911) [4].

Регистрацию вызванных ответов исследуемых мышц проводили до операции, сразу после операции и через каждый час на протяжении 6 часов после нанесения контузионной травмы. Эпидуральную стимуляцию на уровне L1 проводили одиночными стимулами длительностью 0,5 мс, при интенсивности стимуляции в диапазоне от 0,5 до 10 В (экспериментальная установка со стимулятором и усилителем A-M systems). Проводили анализ изменений максимальной амплитуды вызванных ответов, как среднее из семи ответов и представлены в процентах от контрольной величины.

Для оценки количества МПС в тканях спинного мозга определяли концентрации исходного МПС, так и продукт его гидролиза — метилпреднизолон (МП) в органическом субстрате с использованием хромато-масс-спектрометрии.

Двигательная функция оценивалась в открытом поле, используя систему скрининга БББ (шкала Бассо, Битти и Бреснахан [5]).

Крысы случайным образом, слепо были распределены на группы:

1. Группа животных с травмой спинного мозга без лечения (ТСМ; n=7);
2. Группа, животные которой получали однократную высокую дозу метилпреднизолон сукцината натрия (30 мг / кг) внутривенно сразу после травмы, далее через 8 часов после травмы, с последующим повторным введением через 24 и 48 часов после травмы (МПС Инф; n=8).
3. Группа, животные которой получали однократную высокую дозу метилпреднизолон сукцината натрия (30 мг / кг) внутривенно сразу после травмы (МПС; n=5).
4. Группа животных с лечением МПС в комбинации с полимером, которым апплицировали комплекс МПС и полимера на твердую оболочку травмированной части спинного мозга в течение 6 часов (МПС+L6; n=8).
5. Группа животных, которым апплицировали полимер на твердую оболочку травмированной части спинного мозга в течение 6 часов (L6; n=8).
6. Группа животных, которым апплицировали МПС на твердую оболочку травмированной части спинного мозга в течение 6 часов в нейтральном геле (Аплик. МПС, n=5).

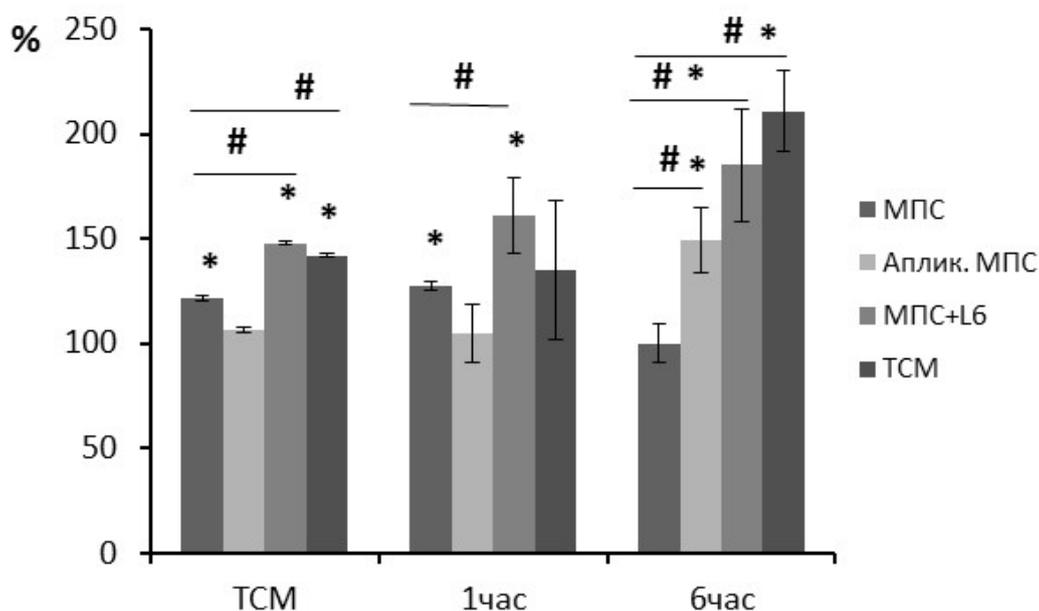


Рис. 1. Изменение амплитуды вызванных моторных ответов икроножной мышцы при эпидуральной стимуляции спинного мозга у крыс с контузионной травмой спинного мозга при различных способах доставки метилпреднизолона сукцината. За 100% приняты значения до оперативного вмешательства. По оси абсцисс обозначено время регистрации ТСМ — сразу после нанесения ТСМ, 1 час — через 1 час после травмы, 6 час — через 6 часов после травмы; по оси ординат — значение максимальной амплитуды моторных ответов икроножной мышцы на эпидуральную стимуляцию спинного мозга в%; различными оттенками показаны группы (см. описание в методах); * — $p < 0.05$ — сравнение с до операционными значениями; # — $p < 0.05$ — сравнение между группами

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

Результаты исследования и их обсуждение

В нашем исследовании использование МПС для лечения в острой фазе ТСМ у крыс не привело к функциональному восстановлению двигательных функций при оценке моторной функции в открытом поле с использованием шкалы БББ, что было показано и в других исследованиях [6;7]. Кроме того, выживаемость животных в группе МПС Инф была менее 50%. В литературе показано, что при использовании больших доз глюкокортикоидных стероидов у пациентов с повреждением спинного мозга нейропротекторные свойства МПС могут быть компенсированы отрицательным действием высоких доз препарата, которые могут поставить под угрозу неврологическое восстановление и даже выживание больных с острым повреждением спинного мозга [8].

Мы предположили, что большинство побочных эффектов терапии МПС относятся к высокой системной дозировке и связанной с ней токсичности и что плохое восстановление двигательных функций, также является отражением неэффективной дозировки в месте повреждения. Кроме того, как было показано выше, система непрерывного введения МПС может привести к различным побочным эффектам. В научно-исследовательской лаборатории «Биоактивные полимеры и пептиды» КФУ (научный руководитель Абдуллин Т.И., к.н.) проводятся междисциплинарные исследования и разработки системы доставки лекарств. В лаборатории было получено новое средство доставки биологически активных веществ в клетки и ткани организма, представляющее собой двифункциональные и трифункциональные окисленные сополимеры этиленоксида и пропиленоксида (окисленный сополимер L6003–COOH) [9;10]. Данная разработка позволила внедрить новый подход для локальной и устойчивой доставки МРС на поврежденную ткань спинного мозга за счет использования сополимера. Наши результаты продемонстрировали, что местная доставка комплекса МПС+L6М после повреждения спинного мозга способствовала восстановлению двигательных функций по шкале БББ в хроническом периоде

травмы, то есть можно говорить о нейропротекторном эффекте использованного сополимера.

Для оценки терапевтических эффектов мы использовали методы электрофизиологии. Мы оценивали возбудимость нейронов спинного мозга в первые 6 часов после травмы.

Максимальная амплитуда вызванного ответа икроножной мышцы после контузионной ТСМ возрастала, достигая максимального значения к 6 часам после травмы, увеличиваясь в 2 раза ($p < 0.05$) (рисунок 1). Как видно из рисунка 1 у животных в группе МПС (первый столбик) максимальная амплитуда ответа икроножной мышцы увеличивалась ($p < 0.05$), однако через 6 часов эффекта не отмечали. В группе с аппликацией МПС амплитуда вызванного моторного ответа не изменялась, однако через 6 часов отмечали увеличение амплитуды. В группе МПС+L6 (третий столбик) происходило повышение максимальной амплитуды ответа икроножной мышцы сразу после нанесения травмы до 150% ($p < 0.05$) и в дальнейшем амплитуда ответа повышалась, достигая минимума к 6 часам (185%, $p < 0.05$).

Анализ среднего содержания МПС и метилпреднизолона (МП) в гидролизатах спинного мозга (0,1г) показал,

что МП ожидаемо не обнаруживался в интактном спинном мозге и пробе только с аппликацией полимера. При аппликации МПС на поверхность спинного мозга и при внутривенном введении МПС через 6 часов концентрация суммарного МП была незначительна ($6,2 \pm 1,5$ мкМ и $5,1 \pm 1,6$ мкМ, соответственно). Использование МПС с сополимером продемонстрировало значительное повышение метилпреднизолона в тканях спинного мозга ($25,2 \pm 3,5$ мкМ, $p < 0,01$).

Заключение

Наши результаты показали, что локальная доставка МПС с сополимером после повреждения спинного мозга у крыс изменяла возбудимость нейронов спинного мозга и улучшала функциональное восстановление двигательных функций. Кроме того, было показано, что в течение первых 6 часов после травмы сополимер обеспечивал локальное и длительное высвобождение МПС в поврежденный спинной мозг. Таким образом местная доставка МПС в комплексе с сополимером может минимизировать побочные эффекты, связанные с высокой дозой системной доставки МПС, в то же время повышая терапевтическую эффективность МПС для лечения повреждения спинного мозга. Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-01746 А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akhtar A. Z. Animal studies in spinal cord injury: a systematic review of methylprednisolone/ A. Z. Akhtar, J. J. Pippin, C. B. Sandusky//Altern. Lab. Anim. — 2009. — V.37. — P. 43–62.
2. Oejo A. Methylprednisolone/A. Oejo, R. Correa [Updated 2019 Aug 21]. In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544340/>.
3. Sandanaraj, B. S. Noncovalent modification of chymotrypsin surface using an amphiphilic polymer scaffold: implications in modulating protein function/B. S. Sandanaraj, D. R. Vutukuri, J. M. Simard, A. Klaiherd, R. Hong, V. M. Rotello, S. Thayumanavan//J. Am. Chem. Soc. — 2005. — V. 3. — P. 10693–10698.
4. Anderson, T. E. A Controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion/T. E. Anderson//J. Neurosci. Methods. — 1982. — V.6, № 4. — P. 327–333.
5. Basso, D.M. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats/ D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan//J. Neurotrauma. — 1995. — V.12, № 1. — P. 1–21.
6. Weaver, L. C. Methylprednisolone causes minimal improvement after spinal cord injury in rats, contrasting with benefits of an anti-integrin treatment/ L. C. Weaver, D. Gris, L. R. Saville, M. A. Oatway Y. Chen, D. R. Marsh, E. F. Hamilton, G. A. Dekaban//J. Neurotrauma. — 2005. — V. 22, № 12. — P. 1375–1387.
7. Fehlings, M. G. Efficacy and Safety of Methylprednisolone Sodium Succinate in Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review/ M. G. Fehlings, J. R. Wilson, J. S. Harrop, B. K. Kwon, L. A. Tetreault, P. M. Arnold, J. M. Singh, G. Hawrylyuk, J. R. Dettori//Global Spine J. — 2017. — V.7, № 3. — P. 116–137.
8. Galandiuk, S. The two-edged sword of large-dose steroids for spinal cord trauma/S. Galandiuk, G. Raque, S. Appel, H. C. Jr. Polk/Ann. Surg. — 1993. — V. 218, № 4. — P. 419–427.
9. Абдуллин Т. И. Средство доставки биологически активных веществ в клетки и ткани организма и способ его применения [Текст]: пат. 2637633 РФ: МПК А61К 31/00, А61К 47/34 / Абдуллин Т. И., Камалов М. И., Ергешов А. А., Сираева З. Ю., Лавров И. А., Радыгина А. А., Салахиева Д. В; заявитель и патентообладатель Казанский (Приволжский) федеральный университет. № 2015144417; заявл. 15.10.2015; опубл. 05.12.2017, Бюл. № 34.
10. Kamalov, M. Non-invasive topical drug delivery to spinal cord with carboxyl-modified trifunctional copolymer of ethylene oxide and propylene oxide/ Kamalov, M., I. Lavrov, A. Ergeshov, Z. Siraeva, M. Baltin; A. Rizvanov, S. Kuznetcova, N. Petrova, I. Savina//Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. — 2016. — V. 140, № 1. — P. 196–203.

© Балтина Татьяна Валерьевна (tvbaltina@gmail.com),

Сабирова Диана Эмильевна (sabirova.dianka@list.ru), Балтин Максим Эдуардович (Baban.bog@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»