

ЭФФЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕСТНОЙ ГИПОТЕРМИИ ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА У СОБАК

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-01746а)..

EFFECTS OF LOCAL HYPOTHERMIA ON SPINAL CORD INJURY IN DOGS

*G. Yafarova
E. Kadysheva
T. Baltina*

Annotation

The goal of this study was to estimate the influence of local hypothermia on spinal cord condition after contusion. In this study we investigated morphological and structural changes in dogs spinal cord 10 days after a spinal cord contusion with and without local hypothermia applied in acute period (20 minutes after contusion) and also in control animals (with laminectomy). Our results shown that local hypothermia in acute period after spinal cord contusion may have neuroprotective effect and prevent from development of secondary traumatic changes such as apoptosis and inflammation.

Keywords: Spinal cord injury, hypothermia, apoptosis, inflammation.

Яфарова Гузель Гульусовна

К.б.н., ассистент каф. физиологии человека и животных ИФМиБ КФУ, вед. н.с. научно-исследовательского отдела, ГАУЗ "Республиканская клиническая больница МЗ РТ", Казань

Кадышева Екатерина Юрьевна

Аспирант каф. физиологии человека и животных ИФМиБ КФУ

Балтина Татьяна Валерьевна

К.б.н, доцент каф. физиологии человека и животных ИФМиБ КФУ, Казань

Аннотация

Целью данного исследования было оценить влияние местной гипотермии на состояние спинного мозга после его контузии у собак. Исследовали морфологию структур спинного мозга собак на 10 сутки после контузионной травмы на фоне использования местной гипотермии в остром периоде после травмы (20 минут после контузии) и без нее, а также в контроле (ламинэктомия). Наши результаты показали, что использование местной гипотермии в остром периоде после контузии может иметь нейропротекторное действие и задерживать развитие вторичных процессов травмы: апоптоз и воспаление.

Ключевые слова:

Травма спинного мозга, гипотермия, апоптоз, воспаление.

ВВЕДЕНИЕ

На основе предыдущих исследований травма спинного мозга ТСМ может быть описана как четыре процесса: (1) основное механическое повреждение, характеризуется спазмом сосудов и гибелью клеток от прямого воздействия; (2) распространение травмы вследствие сосудистых инсультов, таких как кровотечение и ишемии; (3) иммунные/воспалительные реакции, характеризующиеся апоптозом, демиелинизацией выживших аксонов и иммуно-опосредованной клеточной смертью; (4) стабилизация, характеризующаяся центральной кавитацией и формированием хронического рубца [1–4]. В 1990–е годы, возобновились исследования по использованию умеренной гипотермии на животных моделях: были показаны положительные эффекты при остановке сердца [5], церебральной ишемии [6], и даже бактериального менингита [7]. Гипотермия была успешно применена в 1990 у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой

[8] и, как метода лечения для контроля травматического внутричерепной гипертензии [9]. Нами было показано, что использование локальной гипотермии предотвращает увеличение рефлекторной возбудимости мотонейронов [10]. Сегодня, гипотермия рассматривается как один из нейропротекторных методов терапии. Тем не менее, гипотермия не используется в клинике для лечения травматических повреждений спинного мозга. Нейропротекторные эффекты локальной гипотермии при травме спинного мозга не достаточно определены и должны быть изучены. Целью данного исследования было оценить влияние местной гипотермии на состояние структур спинного мозга после его контузии у собак.

Материалы и методы исследования

Объект исследования

В ходе экспериментов было обследовано 12 собак, беспородных, обоих полов, весом 15±5 кг, возрастом от 1

года. Все эксперименты были выполнены с соблюдением биоэтических норм и одобрены Локальным этическим комитетом федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет". Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялись в соответствии с требованиями Приказа Министерства высшего и среднего специального образования СССР №742 от 13. 11. 1984 г., утвердившего "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных", которые действуют по настоящее время. И Директивой Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010г. по защите животных, используемых для научных целей (Directive 2010/63/UE on the protection of animals used of scientific purposes).

Экспериментальные группы и протокол исследования

Под комбинированным внутримышечным наркозом с использованием "Zoletil 50" 1 мг/кг и ксилавета инъекционного 0,05 мл/кг – 0,10 мл/кг животным производили стандартную открытую контузионную спинномозговую травму на уровне первого поясничного позвонка по модифицированной методике А. R. Allen [11]. Результаты оценивали на 10 сутки после операции.

Было выделено 4 экспериментальных группы:

1. Животные с ламинэктомией без контузионной травмы спинного мозга (ТСМ) (n=4).
2. Животные с ламинэктомией с контузионной ТСМ (n=4).
3. Животные, получившие терапевтическое лечение в остром периоде – местная гипотермия 20 минут после ламинэктомии и нанесения контузионной ТСМ (n=4).

Использовался приготовленный хладагент, который на 20 минут помещался в декомпрессионном окне ламинэктомированного позвонка на твердую мозговую оболочку спинного мозга. Все процедуры проводились по авторской методике Тумакаева Р. Ф. [12] и подробно описанной в предыдущем исследовании [10].

Гистологические методы

Морфологическое изучение и количественная оценка изменений структур спинного мозга производилась при помощи светового микроскопа. Были исследованы стандартные гистологические препараты на предметных силикатных стеклах, после депарафинирования и просветления, окрашенные гематоксилин–эозином, заключенные в полистерол.

Иммуногистохимия

Фрагментацию ДНК оценивали с помощью TUNEL, с помощью коммерческого набора Click-iT® TUNEL Alexa Fluor кит, производства Invitrogen. Ткань фиксировали 4% параформальдегидом в течении 24 часов. Затем ткань помещали в 20% раствор сахарозы на фосфатном буфере (PBS). Далее с помощью вибротома получали срезы толщиной 20 мкм, которые помещали в холодильник при температуре –20°C. Окрашивание производили в соответствии с прилагаемой инструкцией. При этом преиммобилизация производилась в растворе (0,25% TritonR X–100 на PBS) в течении 20 минут при комнатной температуре. Затем срезы отмывали деионизированной водой. Для позитивного контроля часть срезов обрабатывали ДНКазой на прилагаемом буфере в течении 30 минут при комнатной температуре. Далее все срезы инкубировали 10 минут в TDT–реакционном буфере, а затем не промывая 60 минут при 37 °C в TDT–реакционном коктейле. После этого все срезы промывали 3% BSA на PBS 2 раза по 5 минут. Далее проводили Click-iT реакцию 30 минут в темноте при комнатной температуре (коктейль из реагентов, содержащих флуоресцентную метку Alexa 488, которая дает зеленое свечение). После этого срезы отмывали 3% BSA на PBS 2 раза по 15 минут. Ядра клеток (ДНК) подкрашивали раствором Hoechst 33342 в разведении 1:5,000 на PBS 15 минут в защищенном от света месте с последующей отмывкой PBS 2 раза по 15 минут. Срезы располагали на стекла и закрывали глицерином. Визуализация проводилась с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа Carl Zeiss (Германия) LSM 510–Meta. Подсчитывали количество мотонейронов и глиальных клеток вступивших в апоптоз соответствующих экспериментальных групп животных.

Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета прикладных программ "Biostat" с использованием критерия Уилкоксона при 95% уровне значимости (P<0,05).

Результаты исследования и их обсуждение

Гистопатологическое исследование структур спинного мозга

К 10 суткам после спинномозговой травмы в спинном мозге наблюдали отсутствие оболочек, кровоизлияния в стадии резорбции–организации с преобладанием второго процесса, наличие клеточных запусений в сером и белом веществе. В передних рогах наблюдается неравномерное кровенаполнение, наличие геморрагических экстравазатов, смешанный отек, невротиты изменены по типу центральной тинкториальной ацидофилии, острого набухания, первичного раздражения, в промежуточных

ядрах – ишемические изменения нервных клеток.

В задних рогах – неравномерное кровенаполнение с преобладанием гиперемии, наличие лейкостазов, смешанный отек, нейроны изменены по типу острого набухания, в области дорсальных ядер – признаки тяжелых и ишемических изменений. Изменения затрагивали как область травмы, так и на 4 мм краниальнее и каудальнее места травмы.

При гистологическом исследовании образцов в группе с использованием местной гипотермии на 10 сутки выявлены локальные нарушения микрогемодинамики в виде спазма сосудов, отмечено их малокровие, набухание эндотелия, единичные плазмостазы, минимальное расширение периваскулярных пространств, изменение нервных клеток по типу первичного раздражения в виде увеличения размеров тел нейроцитов без их существенной деформации, ядра нейроцитов лишь увеличены в размерах, гипохромны, смещение ядер и ядрышек не выявлено.

Таким образом, изучение изменений структур спинного мозга в остром посттравматическом периоде показало типичность стадийных изменений в нем, а также эффективность применения 20 минутной гипотермии в остром периоде после травмы.

Количественное определение гибели клеток с использованием метода TUNEL

В группе животных, которым проводили дозированную контузию спинного мозга без последующего лечения, выявлено выше травмы 61 ± 5 TUNEL-положительных мотонейрона, в месте травмы 7 ± 2 TUNEL-положительных мотонейрона и 25 ± 10 TUNEL-положительных глиальных клеток (рис.1).

Вокруг вступивших в апоптоз нейронов визуализируются полости. Некоторые полости заполнены скоплениями глиальных клеток. Плотные скопления глиальных клеток окружают также специфически окрашенные нейроны (рис.2А).

В сером веществе визуализируются тяжи глиальных клеток демонстрирующих специфическую реакцию на апоптоз (рис. 3А). Ниже травмы визуализировалась высокая степень дегенерации структур, морфологический анализ которых был сильно затруднен. Многочисленные апоптозные тельца идентифицируются в сером веществе (рис.3А). Вероятно это заключительная стадия апоптоза нейронов, когда дегенерировавшие нейроны фагоцитируются глиальными клетками и макрофагами. Таким образом, наблюдается картина активной гибели путем апоптоза нейронов, которая началась на более ранних сроках, о чем свидетельствуют многочисленные апоптозные тельца. В этой группе животных число TUNEL-положительных мотонейронов максимальное, по сравнению с другими экспериментальными группами.

Ламинэктомия сама по себе без контузии привела к

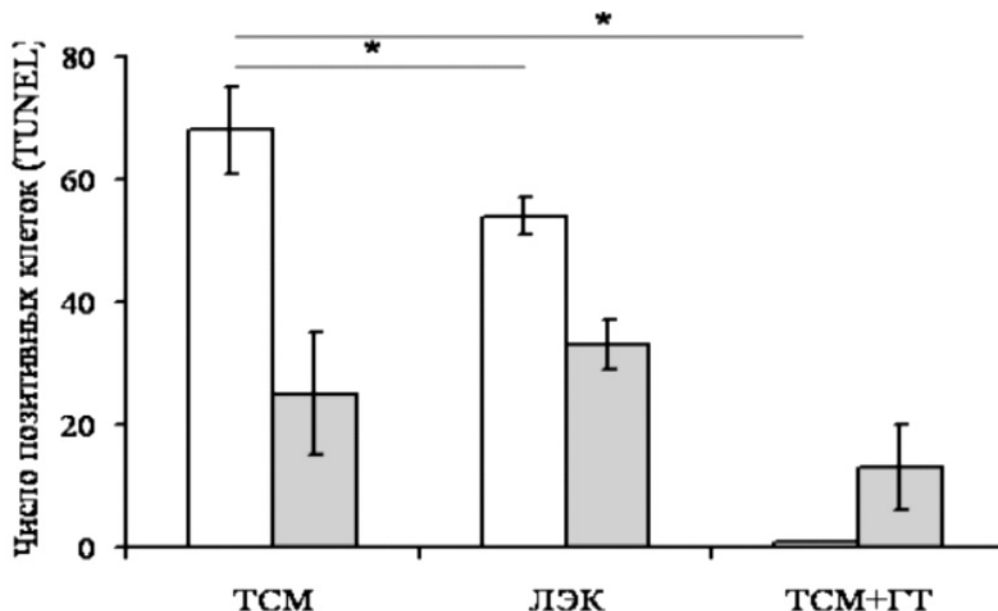


Рисунок 1. Количество TUNEL-положительных клеток в структурах спинного мозга на 10 сутки после экспериментального воздействия.

ТСМ - в группе животных с травмой спинного мозга, ЛЭК - с ламинэктомией,

ТСМ+ГТ - группа с травмой спинного мозга и локальной гипотермией;

белые столбики - количество мотонейронов, серые столбики - количество глиальных клеток; * - уровень достоверности $p < 0.05$.

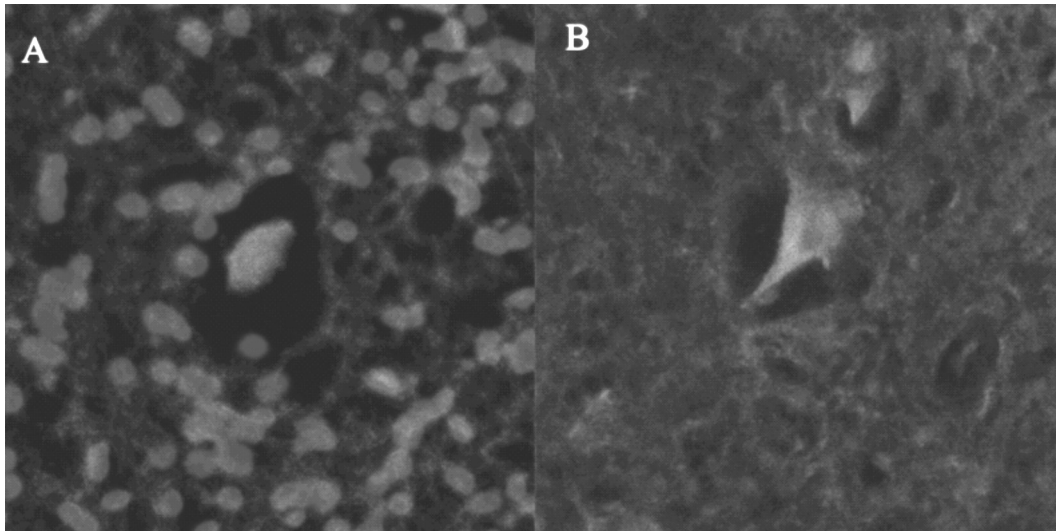


Рисунок 2. Микрофотография спинного мозга собаки (травма на уровне L1), окраска методом TUNEL, конфокальная микроскопия, увеличение об. x 100;

А - в группе животных с травмой спинного мозга,

В - с ламинэктомией. Вокруг нейронов визуализируются полости.

Некоторые полости заполнены скоплениями глиальных клеток. Плотные скопления глиальных клеток окружают специфически окрашенные нейроны.

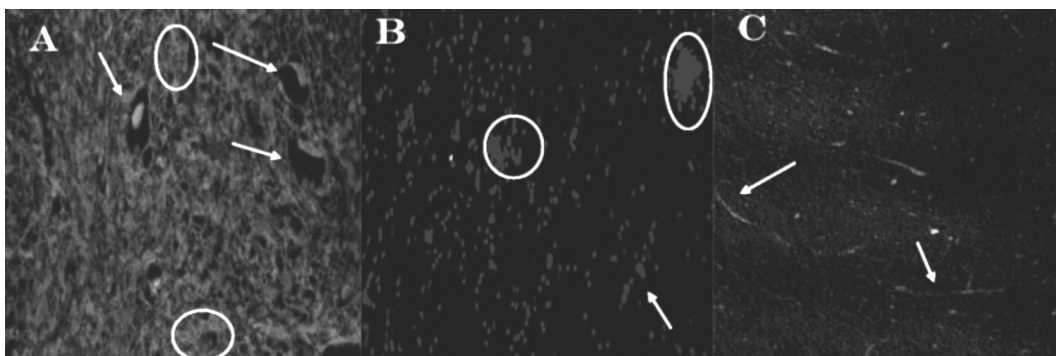


Рисунок 3. Микрофотография спинного мозга собаки (травма на уровне L1), окраска методом TUNEL, конфокальная микроскопия, увеличение об. x 10.

А - в группе животных с травмой спинного мозга,

В - с ламинэктомией, С - группа с травмой спинного мозга и локальной гипотермией.

Визуализируются большое количество скоплений глиальных клеток в виде апоптотных телец (контур) и тяжи глиальных клеток (стрелки).

В белом веществе мотонейроны показывают специфическую реакцию на TUNEL (стрелка) (А).

достаточно сильному отеку всех исследуемых областей спинного мозга. На исследуемых сроках выявлено весьма значительное количество вступивших в апоптоз мотонейронов, причем на всем протяжении исследуемого отрезка спинного мозга. Зарегистрировано 54 ± 3 TUNEL-позитивных нейронов на площади поверхности среза спинного мозга (рис.1).

Тела нейронов сильно видоизменены по сравнению с нормой, цитоплазма сжата, ядро теряет целостность ка-

риоплазмы (рис.2В). Вокруг погибающего нейрона имеются большие полости. На периферию полостей мигрируют глиальные клетки. При этом ядра глиальных клеток, образующих апоптотные тельца, демонстрируют свечение в зеленом диапазоне, специфичное для TUNEL (33 ± 4 клетки) (рис.3В).

В группе с использованием локальной гипотермии выше и ниже места травмы структура спинного мозга не очень хорошо сохранилась. TUNEL-позитивных нейронов

не выявлено. Имеется небольшое количество апоптозных телец. В очаге травмы в большом количестве имеются апоптозные тельца и тяжи глиальных клеток (10 ± 7 TUNEL-позитивных глиальных клеток) (рис.3С) TUNEL-позитивных нейронов не выявлено. Вероятно, апоптоз нейронов на стадии окрашивания TUNEL произошел на более ранних сроках после травмы.

Таким образом, наши эксперименты продемонстрировали небольшой положительный эффект использования локальной гипотермии в остром периоде после травмы на сохранность клеточных элементов спинного мозга, а также развитие вторичных изменений – воспаления и апоптоза. В целом, по литературным данным переохлаж-

дение оказывает защитное действие, запуская в головном мозге после ишемии–реперфузии или травмы некоторые процессы: на ранних этапах – это уменьшение церебрального метаболизма, митохондриальной дисфункции, нарушение работы ионных насосов, и эксайтотоксичности [13]. Вторично, переохлаждение ослабляет реперфузионное повреждение, воспаление, апоптоз, изменяет проницаемость гематоэнцефалического барьера и снижает отеки [14], гипотермия может также играть роль в регенерации нейронов и клеток глии [15].

Тем не менее, помимо нейропротекторных эффектов, в равной степени важно понять общие физиологические последствия этого лечебного воздействия и потенциальных рисков его реализации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dumont R.J., Okonkwo D.O., Verma R.S., Hurlbert R.J., Boulos P.T., Ellegala D.B., Dumont A. S. Acute spinal cord injury, part I: Pathophysiologic mechanisms// Clin. Neuropharmacol. – 2001 – V.24, №5. – P. 254–264.
2. Rossignol S., Schwab M., Schwartz M., Fehlings M.G. Spinal cord injury: time to move?//J. Neurosci. – 2007. – V.27, №44. – P. 11782–92.
3. Fehlings M.G., Nguyen D.H. Immunoglobulin G: A Potential Treatment to Attenuate Neuroinflammation Following Spinal Cord Injury//J. Clin. Immunol. – 2010. – V.30, №1. – P.109–112.
4. Shin T., Ahn M., Moon C., Kim S., Sim K–B. Alternatively activated macrophages in spinal cord injury and remission: another mechanism for repair?//Mol. Neurobiol. – 2013. – V.47, №3. – P. 1011–19.
5. Leonov Y., Sterz F., Safar P., et al. Mild cerebral hypothermia during and after cardiac arrest improves neurologic outcome in dogs//J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1990. – V.10, №1. – P.57–70.
6. Ridenour T.R., Warner D.S., Todd M.M., McAllister A.C. Mild hypothermia reduces infarct size resulting from temporary but not permanent focal ischemia in rats//Stroke. – 1992. – V.23, №5. – P.733–8.
7. Irazuzta J.E., Pretzlaff R., Rowin M., Milam K., Zemlan F.P., Zingarelli B. Hypothermia as an adjunctive treatment for severe bacterial meningitis//Brain Res. – 2000. – V. 881, №1. – P.88–97.
8. Marion D.W., Penrod L.E., Kelsey S.F., et al. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia//N. Engl. J. Med. – 1997. – V.336, №8. – P.540–6.
9. Shiozaki T., Sugimoto H., Taneda M., et al. Effect of mild hypothermia on uncontrollable intracranial hypertension after severe head injury// J. Neurosurg. – 1993. – V.79, №3. – P.363–8.
10. Iafarova G. G., Tumakaev R. F., Haziyeva A. R., and Baltina T. V. Effect of Local Hypothermia on H₂ and M₂ Responses after Spinal Cord Contusion in Dogs//Biophysics. – 2014. – V.59, №5. – P. 829–33.
11. Anderson T. E. A Controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion//J. Neurosci. Methods. – 1982. – V.6, №4. – P.327–333.
12. Tumakaev R.F. Hypothermia of the spinal cord. [Article in Russian] //Zh. Vopr. Neurokhir. Im. N. N. Burdenko. – 2010. – №2. – P. 51–53.
13. Yenari M.A., Han H.S. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia//Nat. Rev. Neurosci. – 2012. – V.13, №4. – P.267–278.
14. Polderman K.H. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia//Crit. Care. Med. – 2009. – V. 37, Suppl 7. – P.186–202.
15. Karnatovskaia L.V., Wartenberg K.E., Freeman W.D. Therapeutic hypothermia for neuroprotection: history, mechanisms, risks, and clinical applications//Neurohospitalist. – 2014. – V.4, №3. – P. 153–63.

© Г.Г. Яфарова, Е.Ю. Кадышева, Т.В. Балтина, (gusadila@mail.ru), Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»,

Санкт-Петербургский международный книжный салон

Время читать!
Time to read!

"Ни о чем не думает лишь тот, кто ничего не читает."
Д.Дидро