

## РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

### ДИМЕФОСФОН ВОССТАНАВЛИВАЕТ ФУНКЦИИ ПОВРЕЖДЕННОГО СПИННОГО МОЗГА

Р. Ф. Тумакаев<sup>1</sup>, Д. С. Гусева<sup>2</sup>, Р. С. Гараев<sup>2</sup>

Проведена оценка влияния димефосфона, применяемого в клинике в качестве вазоактивного средства при травматическом повреждении головного мозга, на восстановление функций спинного мозга у собак при его травматическом поражении. Травму спинного мозга наносили по модифицированной методике Allen. В опытной группе животным внутривенно вводили 2,5 % раствор димефосфона в дозе 18,75 мг/кг с 1-го по 10-й дни после травмы. Восстановление проводимости спинальных путей и состояние пояснично-крестцовых мотонейронов оценивали при помощи метода магнитной стимуляции коры, используя комплекс “Нейротест”, который включает транскраниальный магнитный стимулятор и компьютерный анализатор, и метода стимуляционной электромиографии, позволяющего регистрировать рефлекторные (Н-) и моторные (М-) ответы. Клиническими методами оценивали общее состояние животных, двигательную активность и болевую чувствительность. Морфологический анализ проводили на парафиновых срезах спинного мозга, окрашенных гематоксилин-эозином. Установлено, что димефосфон способствует снижению интенсивности процессов некроза и апоптоза и восстанавливает функции поврежденных отделов спинного мозга.

**Ключевые слова:** травма спинного мозга, электромиографические и гистологические исследования, димефосфон

### ВВЕДЕНИЕ

В основе динамики структурных изменений в спинном мозге после травмы лежит ряд последовательных событий: механическая деформация — разрыв микрососудов — экстравазация крови — частичный лизис эритроцитов — высвобождение значительного количества прооксидантов — ионов железа и меди, являющихся катализаторами свободнорадикального перекисного окисления липидов мембран. Эти события усугубляют вазоспазм, вызывают окклюзию, разрыв компонентов микроваскулярного ложа и в дальнейшем приводят к необратимым изменениям нервных клеток [1]. Ход подобных деструктивных изменений, укладывающихся в рамки сосудистой теории, предполагает возможность применения лекарственных средств для лечения травмы спинного мозга.

В экспериментальных и клинических исследованиях показан широкий спектр биологической активности димефосфона (диметилловый эфир 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты): противовоспалительная активность, противоотечное, иммуномодулирующее, антигипоксическое и антиоксидантное, противоишемическое действие, стимуляция регенераторных процессов, воздействие на метаболизм, направленное на поддержание

гомеостаза на оптимальном уровне, в частности, стимулирующее активность многих ферментных систем. Широкий диапазон фармакологических эффектов объясняется нормализующим влиянием на процессы перекисного окисления липидов [2 – 5, 6]. В некоторых работах показана нейрометаболическая активность димефосфона [3, 4].

В настоящей работе исследовали влияние димефосфона на восстановление функций поврежденного спинного мозга у взрослых собак.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 28 половозрелых беспородных собаках (самцы и самки). Под диссоциативной анестезией (кетамин, 6 – 8 мг/кг, внутримышечно) с добавлением местной анестезии наносили стандартную открытую позвоночно-спинномозговую травму на уровне первого поясничного позвонка по модифицированной методике Allen (1914) [7]. Первой группе животных (контроль,  $n = 14$ ) наносили только открытую позвоночно-спинномозговую травму без применения медикаментов. Во второй группе животным (опыт,  $n = 14$ ) с 1-го по 10-й день после травмы ежедневно однократно внутривенно вводили димефосфон в виде 2,5 % раствора (18,75 мг/кг).

Состояние мотонейронов и проводимость спинальных путей оценивали на 1, 3, 7, 14, 21, 30 и 45-е сутки после операции в контрольной и опытной группах. Ежедневно вели клинические наблюдения, оценивая общее состояние животных (двигательная активность, болевая чувствительность, физиологические функции и т.д.).

<sup>1</sup> ГУ НИЦ Татарстана “Восстановительная травматология и ортопедия”, Казань, 420064, Оренбургский тракт, 138г.

<sup>2</sup> Кафедра фармакологии (зав. — проф. Р. С. Гараев) Казанского государственного медицинского университета, Казань, 420012, ул. Бутлерова, 49.

Функциональную активность мотонейронов пояснично-крестцового отдела спинного мозга изучали методом стимуляционной электромиографии, используя электромиограф фирмы “Медикор”. Для этого регистрировали рефлекторный (Н-) и моторный (М-) ответы. Для стимуляции двигательной зоны коры большого мозга использовали комплекс “Нейротест”, который включает транскраниальный магнитный стимулятор и компьютерный анализатор (Новосибирск). Для тестирования болевой чувствительности использовали покалывание кожи конечностей и туловища животного, щипки кожи лап и туловища, надавливание на кожу лап пинцетом.

Для морфологического анализа на 10-е сутки после спинальной травмы собакам вводили летальную дозу кетамина и извлекали участок спинного мозга длиной 5 см, включающий зону контузии. Образцы фиксировали в 4 % растворе формалина (рН 7,4) в течение суток, промывали в растворе фосфатного буфера (рН 7,4), обезжизняли и заливали в парафин по стандартной гистологической методике. Микротомные срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и анализировали при помощи светового микроскопа (Zeiss) при увеличении  $\times 20$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных первой группы после операции наблюдалось полное угнетение рефлексов задних конечностей и нарушение функции тазовых органов. Восстановление тонуса мышц отмечено через 1,5 – 2 недели после травмы. Попытки помочь животному приподняться в момент кормления были тщетны, поскольку по истечении месяца животное не могло самостоятельно опираться на задние лапы. Чувствительность туловища, конечностей и хвоста была нарушена. Отмечались попытки передвижения на передних лапах при атаксичных волочащихся задних конечностях. У отдельных животных через месяц восстанавливалась функция тазовых органов, появлялись попытки опереться на задние конечности путем их подтягивания, но эти усилия не оканчивались успехом. Сроки выживаемости в данной группе составили от 3-х до 35 суток после операции. Летальность была связана в остром периоде с развитием восходящего отека на фоне спинального шока, а в более поздние сроки животные отказывались от приема пищи.

У животных второй группы спинномозговые рефлексы, регистрируемые дистальнее места травмы, были снижены в первые дни после операции. В мышцах задних конечностей у большинства животных определялась гипотония. Появление анестезии кожи конечностей и туловища отмечали сразу после травмы спинного мозга. Анестезия сменялась на гипостезию уже к концу первых суток, но сохранялась на коже дистальных отделов конечностей и хвоста до третьих суток. На третьи сутки собаки проявляли интерес к корму, во время еды приподнимались на задних лапах, самостоятельно ставили ступни и на некоторое время придавали конечностям обычное положение. В ряде случаев самостоятельное стояние животных наблюдалось и вне акта еды. Во время стояния собаки вначале опирались на тыльную поверх-

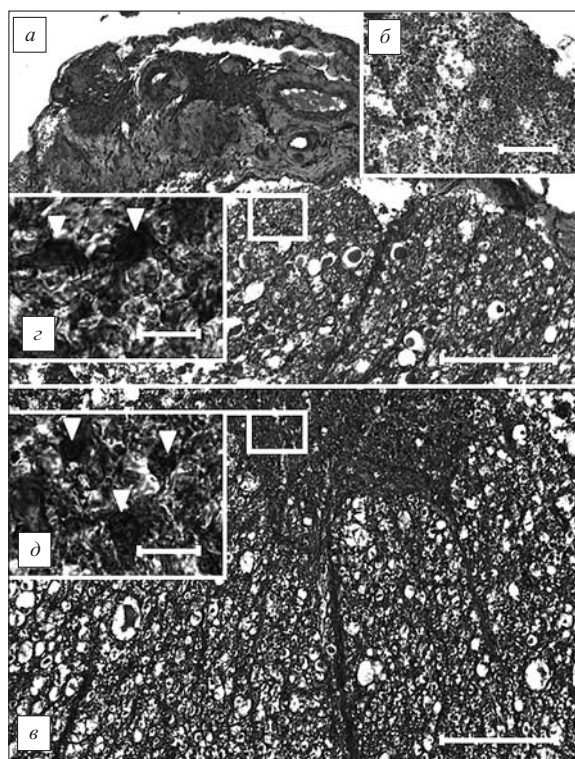
ность, широко расставляя лапы. На пятые сутки наблюдения все животные становились активными и подвижными, продолжительное время стояли на конечностях и самостоятельно передвигались, лишь у одного животного в этот срок наблюдения сохранился легкий нижний парализ, более выраженный слева. При медленной ходьбе тонус мышц задних конечностей у животных этой группы был достаточен для обеспечения шагательных движений, а при быстрой ходьбе уменьшался. Продолжал увеличиваться тонус мышц задних конечностей и одновременно отмечалось восстановление чувствительности задней части туловища, хвоста и задних конечностей, что находило свое выражение в появлении ответных реакций при чесывании или покалывании иглой соответствующих частей туловища, лап и хвоста. На шестые сутки наблюдения общее состояние животных могло квалифицироваться как хорошее. Собаки прибавляли в весе, волосяной покров приобретал опрятность. В этот период увеличивалась продолжительность стояния на всех лапах без развития признаков утомления, во время ходьбы улучшалась координация движений. По истечении семи суток наблюдений состояние животных продолжало улучшаться — они долго и прочно стояли на лапах, шагательные движения были хорошо координированы, чувствительность туловища, конечностей и хвоста восстанавливалась. Большую часть времени собаки проводили в движении, наблюдалось нормальное отправление всех физиологических функций при хорошем аппетите и нормальной температуре тела.

До нанесения травмы максимальная амплитуда Н-ответа составила в среднем  $1,4 \pm 0,2$  мВ, М-ответа —  $4 \pm 0,5$  мВ, а отношение максимальных амплитуд Н- и М-ответов —  $39 \pm 6$  %. Анализ Н- и М-ответов квадратной мышцы подошвы у животных контрольной группы после операции показал разнонаправленные изменения амплитуды Н-ответов, но в целом отмечалось ее незначительное снижение по сравнению с показателями, полученными до травмы. Так, значение Н/М у животных этой группы было выше, чем у интактных животных (здоровые собаки до нанесения травмы), с максимумом на 13-е сутки после операции. Данное увеличение обусловлено незначительным снижением амплитуды Н-ответов на фоне значительного понижения максимальных амплитуд М-ответов, что может быть связано с развитием паралича задних конечностей. Тем не менее, общее увеличение соотношения максимальных амплитуд Н- и М-ответов дает основание говорить об увеличении пула реагирующих мотонейронов.

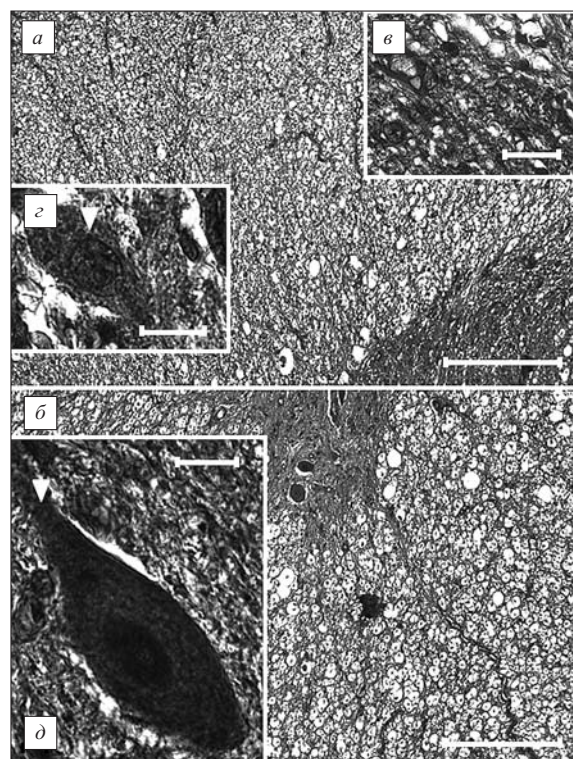
В опытной группе животных на десятые сутки после операции наблюдалось снижение показателя Н/М, связанное со значительным уменьшением амплитуды Н-ответов, хотя в восстановительном периоде амплитуда Н-ответов постепенно возрастала. Полученные результаты указывают на то, что применение димефосфона, возможно, приводит к уменьшению возбудимости реагирующих мотонейронов в остром периоде спинальной травмы.

При транскраниальной магнитной стимуляции у всех интактных животных были зарегистрированы моторные





**Рис. 1.** Микрофотография срезов спинного мозга собак первой группы на 10-й день после травмы спинного мозга. Шкала: *а, в* — 200 мкм; *б* — 50 мкм; *в, д* — 20 мкм. Окраска гематоксилин-эозином. Стрелками указаны нейроны с признаками апоптоза в переднем (*в*) и заднем (*д*) рогах спинного мозга.



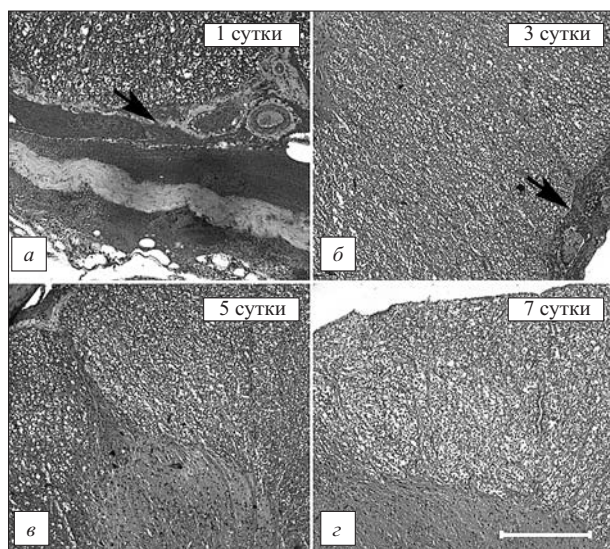
**Рис. 2.** Микрофотография срезов спинного мозга собак второй группы на 10-й день после травмы спинного мозга. Шкала: *а, в* — 200 мкм; *б* — 50 мкм; *в, д* — 20 мкм. Окраска гематоксилин-эозином. Стрелками указаны нейроны переднего (*в*) и заднего (*д*) рогов спинного мозга.

ответы передних большеберцовых мышц. Пороговая сила стимуляции в среднем составила  $78,7 \pm 3 \%$ , латентный период ответов —  $18,3 \pm 0,7$  мс. В первой группе животных, начиная с первых суток после нанесения травмы, транскраниальная стимуляция не приводила к возникновению ответов в передней большеберцовой мышце. Выявлена отчетливая корреляция с неврологической картиной, что свидетельствует о дисфункции пирамидного тракта на уровне травмы. У животных, которым вводили димефосфон, транскраниальная стимуляция вызывала моторные ответы в передних большеберцовых мышцах у 90 % собак уже через сутки после травмы. Моторные ответы регистрировали на протяжении всего эксперимента. При исследовании динамики порога Н-ответа передней большеберцовой мышцы у данной группы животных выявлено, что для вызова моторных ответов в мышцах задних конечностей требовалась меньшая сила раздражения коры большого мозга, чем у интактных животных. Через 30 суток после операции эти показатели возвращались к исходному дооперационному уровню. Полученные результаты указывают на то, что применение димефосфона способствует быстрому восстановлению проведения сигналов по поврежденному сегменту спинного мозга. Снижение порога Н-ответа при транскраниальной магнитной стимуляции в острый период может свидетельствовать как о повышении возбудимости спинальных мотонейронов в зоне травмы, так и о повышении возбудимости кор-

тикальных мотонейронов вследствие активации восходящих путей спинного мозга.

Морфологический анализ срезов спинного мозга, выполненных на уровне очага поражения показал, что в первой группе животных на 10-й день при гистологическом исследовании наблюдался обширный отек мозговой ткани с очаговым кровоизлиянием (рис. 1, А, Б), а также некротический очаг, который включал остатки разрушенных клеток и клетки, участвующие в развитии воспаления, неизменно развивающегося в результате некроза. На ранних этапах некроза наблюдали картину с характерными типичными признаками, позже происходило разрушение мембран и дезинтеграция клетки. Наряду с некрозом в момент травмы запускается механизм отсроченного (вторичного) повреждения клеток, в основе которого лежит апоптоз [8, 10, 11], представляющий собой физиологическую гибель клеток, необходимую для обновления клеточного пула органов, дифференцировки и развития тканей [9]. При микроскопическом исследовании таких клеток наблюдается конденсация ядерного хроматина, сморщивание тела клетки при сохранной цитоплазматической мембране. На гистологических срезах спинного мозга животных первой группы отмечено также большое количество нейронов с признаками апоптоза (рис. 1, *в, д*).

При использовании димефосфона отек спинного мозга и очаговые кровоизлияния были выражены слабо или отсутствовали (рис. 2, *а, б*). Нейроны передних и задних рогов не проявляли признаков апоптоза и обладали четко



**Рис. 3.** Микрофотографии срезов спинного мозга собак второй группы на 1, 3, 5 и 7-е сутки после травмы спинного мозга. Шкала: а–д — 200 мкм. Окраска гематоксилин-эозином. Стрелками указаны субарахноидальные и субдуральные кровоизлияния в контузионной зоне на 1-е и 3-и сутки после травмы.

очерченным ядром и ядрышком без конденсации хроматина (рис 2, з, д). В этой группе животных на первый день после травмы также наблюдались обширные очаговые кровоизлияния (рис. 3, а), однако, их постепенная редукция начинается с третьего дня (рис. 3, б–д). На 7-е сутки значительно уменьшился отек мозговой ткани в зоне контузии, отсутствовали остатки разрушенных клеток, не было апоптотических нервных клеток.

Результаты этого морфологического анализа положительно коррелируют с данными электрофизиологических исследований и оценкой состояния экспериментальных животных клиническими методами. Регресс очаговых кровоизлияний и отека спинного мозга на фоне введения димефосфона сопровождался нормализацией функционального состояния нейронов передних и задних рогов

спинного мозга, отсутствием явных признаков некроза и апоптоза.

Таким образом, результаты исследования указывают, что димефосфон поддерживает нейрональную активность спинного мозга после травмы, что благоприятствует восстановлению функций поврежденных нейронов в зоне контузионного очага, что находит подтверждение данными микроморфологического анализа.

## ВЫВОД

При позвоночно-спинальной травме курсовое применение димефосфона, начиная с острого периода патологии, способствует снижению интенсивности процессов некроза и апоптоза и восстанавливает функции поврежденных отделов спинного мозга.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. Г. Баснакян, А. В. Басков, Н. Н. Соколов, И. А. Борщенко, *Вопр. мед. химии*, № 5, 431 – 443 (2000).
2. А. О. Визель, Р. С. Гараев, А. А. Муслинкин, И. А. Студенцова, *Тера Медики*, № 3, 34 – 35 (1998).
3. В. И. Данилов, И. А. Студенцова, *Терра Медики*, № 1, 34 – 35 (2000).
4. В. И. Данилов, В. П. Панкова, И. А. Студенцова, А. О. Визель, *Нейрохирургия*, № 2, 43 – 48 (2002).
5. И. В. Заиконникова, И. А. Студенцова, Авт. свид. СССР № 1291152 (1977).
6. И. Я. Раздольский, *Многотомное руководство по хирургии*, Т. 4, Медицина, Москва (1963).
7. И. А. Студенцова, В. И. Данилов, Р. Х. Хафизьянова, *Казан. мед. журн.*, 76(5), 214 – 218 (1995).
8. A. R. Allen, *J. Amer. med. Assoc.*, 9, 878 – 880 (1914).
9. E. Emery, P. Aldana, M. B. Bunge, et al., *J. Neurosurg.*, 89, 911 – 920 (1998).
10. R. A. Lockshin and Z. Zakeri-Milovanovic, Cell ageing and cell death (I. Devis, and D. C. Sigl, eds.), *Cambridge*, 243 (1984).
11. J. Lou, L. G. Lenke, F. J. Ludwig, and M. F. O'Brien, *Spinal Cord*, 10, 683 – 690 (1998).
12. C. Yong, P. M. Arnold, M. N. Zoubine, et al., *J. Neurotrauma*, 15, 459 – 472 (1998).

Поступила 13.11.09

## DIMEPHOSPHON RESTORES FUNCTIONS OF INJURED SPINAL CORD

R. F. Tumakaev<sup>1</sup>, D. S. Guseva<sup>2</sup>, and R. S. Garaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Center for Restorative Traumatology and Orthopedics, Orenburgskii tract 138g, Kazan, Tatarstan, 420064, Russia

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, Tatarstan, 420012, Russia

In clinical practice, dimephosphon is used as a vasoactive agent in cases of traumatic brain injury. We have studied the influence of dimephosphon on the functional recovery of dog spinal cord after lesion. The spinal cord trauma was modeled using the methods described by Allen. In a period of time from the 1st to 10th day after injury, experimental group of animals was treated intravenously with 2.5% dimephosphon solution (18.75 mg/kg). The recovery of conduction in descending spinal nerves was studied using the transcranial magnetic stimulation technique on the Neurotest complex comprising a transcranial magnetic stimulator and a computer analyzer. The state of sacrolumbar motoneurons was determined by the method of stimulation electromyography that allows both H-reflex and M-wave responses to be recorded. The status of experimental animals, their locomotor activity and pain sensation were evaluated using standard clinical assessment. Morphological analysis performed with paraffin sections (hematoxylin-eosin staining) demonstrated that dimephosphon decreased the initiation of apoptosis and necrosis and supported the recovery of injured parts of spinal cord. Thus, the results revealed a beneficial effect of dimephosphon administration on the functional recovery of injured spinal cord.

**Key words:** Spinal cord injury, electromyography, histological method, dimephosphon