

© Л. С. Онищенко, Д. А. Искра, 2013  
УДК 611.892:616-005.4:615.847.8:599.323.4

*Л. С. Онищенко и Д. А. Искра*

## СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ УЗЛОВ СПИНОМОЗГОВЫХ НЕРВОВ ПРИ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ МАГНИТНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОЙ МИЕЛОПАТИИ

Кафедра нервных болезней (зав. — чл.-кор. РАМН проф. М. М. Одинок), Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Целью настоящего исследования было установление связи морфологических изменений чувствительных узлов спинномозговых нервов (УСН) с клинической симптоматикой у крыс с экспериментально вызванной ишемической миелопатией (ИМ) при ее лечении повторяющейся магнитной стимуляцией (ПМС) и без него. В связи с этим у 16 крыс с ИМ при помощи электронной микроскопии изучали эффективность и механизмы действия ПМС на чувствительные УСН. По результатам лечения в чувствительных УСН как на отдалении от места повреждения (поясничные УСН), так и вблизи от него (шейные УСН) обнаружены морфологические признаки регенераторно-репаративных процессов как в клетках, так и в нервных волокнах (восстановление структуры органелл в цитоплазме нейронов и нейролеммоцитов, увеличение количества последних и ремиелинизация волокон). Выраженность структурных изменений коррелировала со степенью восстановления функций.

**Ключевые слова:** чувствительный узел спинномозгового нерва, ишемическая миелопатия, повторяющаяся магнитная стимуляция, электронная микроскопия

Распространенность сосудистых поражений спинного мозга в структуре неврологической патологии не превышает 4%. Однако частые ошибки в диагностике и неудовлетворительные результаты лечения ишемических миелопатий (ИМ) позволяют считать их исследование крайне актуальным для современной медицины [4]. В этой связи важно изучение терапевтической эффективности и механизмов действия новых перспективных способов лечения. В последние годы большое внимание уделяется исследованиям повторяющейся магнитной стимуляции (ПМС) структур ЦНС. Приводятся убедительные данные о высокой терапевтической эффективности этого метода [2, 7]. В то же время, механизмы восстановления функций у больных с ИМ при их лечении ПМС до конца не изучены [6, 7]. Решению этих вопросов, безусловно, должно способствовать изучение структурных изменений, лежащих в основе наблюдаемого при ПМС клинического улучшения.

Цель настоящего исследования — выявить связь морфологических изменений в чувствительных узлах спинномозговых нервов (УСН) при ПМС у крыс с экспериментальной моделью ИМ с клинической симптоматикой.

Материал и методы. Эксперимент был выполнен на 31 взрослой крысе линии Вистар обоего пола, массой 180–

200 г. Исследования осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (ссылка в письмах Рособнадзора от 22.12.2007 г. и Министерства образования и науки РФ от 30.11.2007 г.).

У 16 животных была воспроизведена модель ИМ по методу А. Tadahiko [8]. Крысам, анестезированным внутривентрикулярно калипсолом в дозировке 10 мг/кг, производили ампутацию передних конечностей в проксимальных суставах. В результате изменения статики позвоночника, из-за перераспределения массы тела на задние лапы у всех животных через 2 мес сформировался кифоз со сдавлением спинного мозга в среднегрудном отделе. Контрольную группу составили 15 здоровых крыс.

Через 95 сут от начала эксперимента животные с моделью ИМ были разделены на 2 группы сравнения. Крысам 1-й группы (n=8) проводили ПМС чувствительных УСН на уровне повреждения спинного мозга (среднегрудной отдел). Процедуру осуществляли с помощью магнитного стимулятора Mag-2 (Dantec, Дания), малой круглой катушкой, монофазными импульсами интенсивностью 110% от пороговых значений и частотой 0,3 Гц. Катушку располагали перпендикулярно к стимулируемой области с направлением тока в ней противоположно направлению хода эфферентных волокон спинного мозга. Стимуляции проводили ежедневно в течение 5–7 мин; общее число — 30 процедур на курс лечения. В начале и в конце курса терапии выполняли клинические исследования, включавшие изучение реакции животных на болевое раздражение хвоста, определение возможности передвигаться вверх по доске с наклоном 27°. Крысам 2-й группы (n=8) ПМС не проводили.

Для проведения гистологических и электронно-микроскопических исследований на 125-е сутки экспери-

### Сведения об авторах:

Онищенко Людмила Семеновна, Искра Дмитрий Анатольевич (e-mail: iskradm@mail.ru), кафедра нервных болезней, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

мента брали чувствительные УСН (поясничные — удаленные от очага повреждения и шейные — расположенные близко к очагу повреждения спинного мозга). Взятие материала производили по методу Б. С. Дойникова в модификации Г. А. Акимова и В. В. Семенов-Тян-Шанской [1]. Материал для микроскопии фиксировали в 10% формалине, обезживали в этаноле восходящей концентрации и заливали в парафин. Серийные срезы окрашивали гематоксилином-эозином и тионином по методу Ниссля. Для электронно-микроскопического изучения материал обрабатывали по общепринятым стандартным методикам [3]. В последнем случае полутонкие срезы (толщиной 1 мкм) окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля и исследовали под световым микроскопом. Затем изготавливали ультратонкие срезы толщиной до 500 нм, которые исследовали и фотографировали в электронном микроскопе Leo-910 (Carl Zeiss, Германия).

**Результаты исследования.** У животных обеих экспериментальных групп и при световом, и при электронно-микроскопическом исследовании наблюдались морфологические изменения в чувствительных УСН как вблизи очага поражения спинного мозга, так и на отдалении от него. Эти изменения (от слабых до значительных) были представлены дистрофией нейронов и глио-

цитов по светлому либо темному типу. В части нервных волокон определялись демиелинизация и, в меньшей степени, аксональная дегенерация. Эти структурные нарушения были более выражены и встречались чаще у экспериментальных крыс 2-й группы, не получавших лечения ПМС.

Морфологическим изменениям соответствовали клинические данные. Общее состояние крыс в обеих группах сравнения оставалось удовлетворительным в течение всего периода наблюдений. Нарушения движений у животных определялись только через 2–3 нед после ампутации передних конечностей. Расстройства моторной функции с течением времени нарастали и к моменту первого осмотра достигали отчетливо выраженного парализа у двух крыс в 1-й и одной крысы — во 2-й группе сравнения. У остальных животных определялось умеренное снижение силы мышц в задних лапах. Чувствительные нарушения (при болевом раздражении хвоста) отмечались у двух крыс в 1-й и у четырех — во 2-й группе. Выраженность трофических расстройств находилась в прямой связи со степенью моторного и чувствительно-

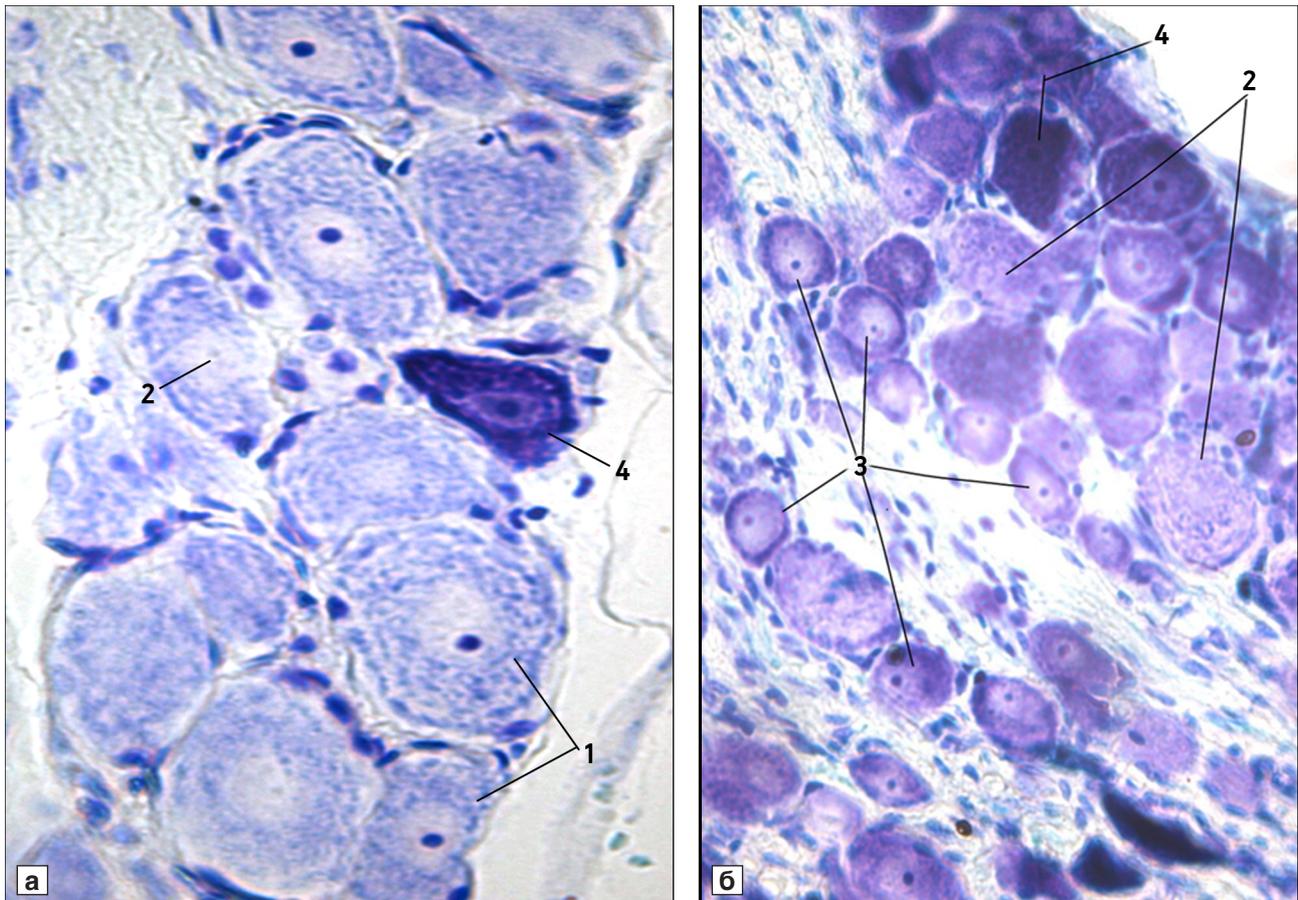


Рис. 1. Поясничные узлы спинномозговых нервов крысы при ишемической миелопатии без лечения (а) и после лечения повторяющейся магнитной стимуляцией (б).

1 — нейроны в состоянии острого набухания; 2 — клетки-тени; 3 — клетки в состоянии первичного раздражения; 4 — гиперхромные нейроны. Окраска тионином по методу Ниссля. а — об. 40, ок. 10; б — об. 20, ок. 10

го дефицита. Выявленные структурные изменения вместе с обнаруженными клиническими расстройствами подтверждали валидность выбранной модели для эксперимента.

Поражение структуры и шейных, и поясничных УСН было более характерным для крыс обеих групп с явными клиническими нарушениями. При световой микроскопии у крыс с сенсорным дефицитом нейроны были набухшими, контуры их — сглаженными. Глыбки хроматофильного вещества были мелкими, часто пылевидными и слабо окрашивались. Определялось просветление нуклеоплазмы, ядро было смещено к периферии клетки. Изредка обнаруживались дистрофические изменения нейронов УСН по типу отека. Контуры этих клеток были нечеткими, а вокруг ядер выявлялась просветленная цитоплазма. Хроматофильное вещество располагалось по периферии цитоплазмы в виде узкого ободка и было гомогенно окрашенным. Реже обнаруживались изменения нейронов по типу острого набухания. Ядра этих клеток были несколько увеличены и диффузно окрашивались. В цитоплазме определялась мелкая базофильная зернистость (рис. 1, а).

Проводимая в 1-й группе сравнения ПМС способствовала восстановлению морфологических нарушений. У животных этой группы наблюдалась наиболее отчетливая связь структурных признаков регенераторно-репаративных процессов с регрессом неврологической симптоматики. В 1-й группе в отличие от 2-й группы (без лечения) только у одной особи были обнаружены изменения нейронов по типу отека. Среди крыс без сенсорного дефицита также лишь у одного животного в нейронах были выявлены начальные признаки первичного раздражения в виде частичного (кольцевидного) хроматолиза, намечающейся эктопии ядра, увеличения размера ядрышка. Указанные изменения нейронов УСН наблюдались, как правило, с обеих сторон, но всегда были неодинаковы по выраженности.

У остальных крыс изменения нейронов заключались лишь в просветлении нуклеоплазмы вследствие уменьшения количества гетерохроматина и в повышении базофилии цитоплазмы (преимущественно по периферии), что можно расценивать как признаки первичного раздражения (см. рис. 1, б).

При электронно-микроскопическом исследовании поясничных и шейных УСН у крыс 2-й группы (с моделью ИМ без лечения) были обнаружены отчетливые и разнообразные нарушения ультраструктуры нейронов, глиоцитов и нервных волокон. При этом структурные элементы микро-

циркуляторного русла почти не имели нарушений, лишь в ряде случаев в капиллярах отмечался стаз эритроцитов. Среди нейронов чувствительных УСН встречались как гиперхромные (дистрофически измененные по темному типу), так и со светлой цитоплазмой (дистрофически измененные по светлому типу). В гиперхромных нейронах контуры ядра были неотчетливы, а каналцы гранулярной эндоплазматической сети (ЭПС) располагались очень плотно. Цистерны комплекса Гольджи иногда были сильно расширены, встречались лизосомы и липофусциновые включения (рис. 2, а). В других нейронах цитоплазма почти не содержала органелл, а сохранившиеся митохондрии, каналцы ЭПС и цистерны комплекса Гольджи часто были вакуолизированы. Кроме того, обнаруживались единичные погибающие нейроны с гиперхромным ядром и ядрышком, а также с вакуолизированными ЭПС, комплексом Гольджи и митохондриями (см. рис. 2, б).

У животных, получавших ПМС, почти во всех структурных элементах, чувствительных УСН, были обнаружены морфологические признаки различной функциональной активности. Одни нейроны по этим признакам имели пониженную, другие — высокую функциональную активность. Цитоплазма нейронов, находящихся в состоянии функционального торможения, содержала большое количество узких каналцев ЭПС и уплотненных цистерн комплекса Гольджи (см. рис. 2, б). Погибающие нейроны обнаружены не были. Часто встречались нормохромные нейроны с признаками высокой функциональной активности. В этих клетках цистерны комплекса Гольджи и каналцы гранулярной ЭПС были умеренно расширенными, часть митохондрий имели почти типичную структуру (см. рис. 2, в). В УСН у крыс без лечения ПМС такие нейроны наблюдались очень редко.

У крыс, получавших лечение ПМС, характерным морфологическим признаком восстановления как нейронов, так и нейролеммоцитов в УСН было большое количество свободных рибосом и полисом в их цитоплазме, а также рибосом, прикрепленных к мембранам ЭПС (см. рис. 2, г).

Как в шейных, так и в поясничных чувствительных УСН у крыс без лечения часть нейролеммоцитов (миелинообразующих глиоцитов) имели типичную структуру ядра и почти не измененную цитоплазму, но у большинства — обнаруживалась гиперхромная или просветленная цитоплазма (рис. 3, а). Таким образом, нейролеммоциты, как и нейроны, имели морфологические признаки дистрофии по темному либо светлому типу.

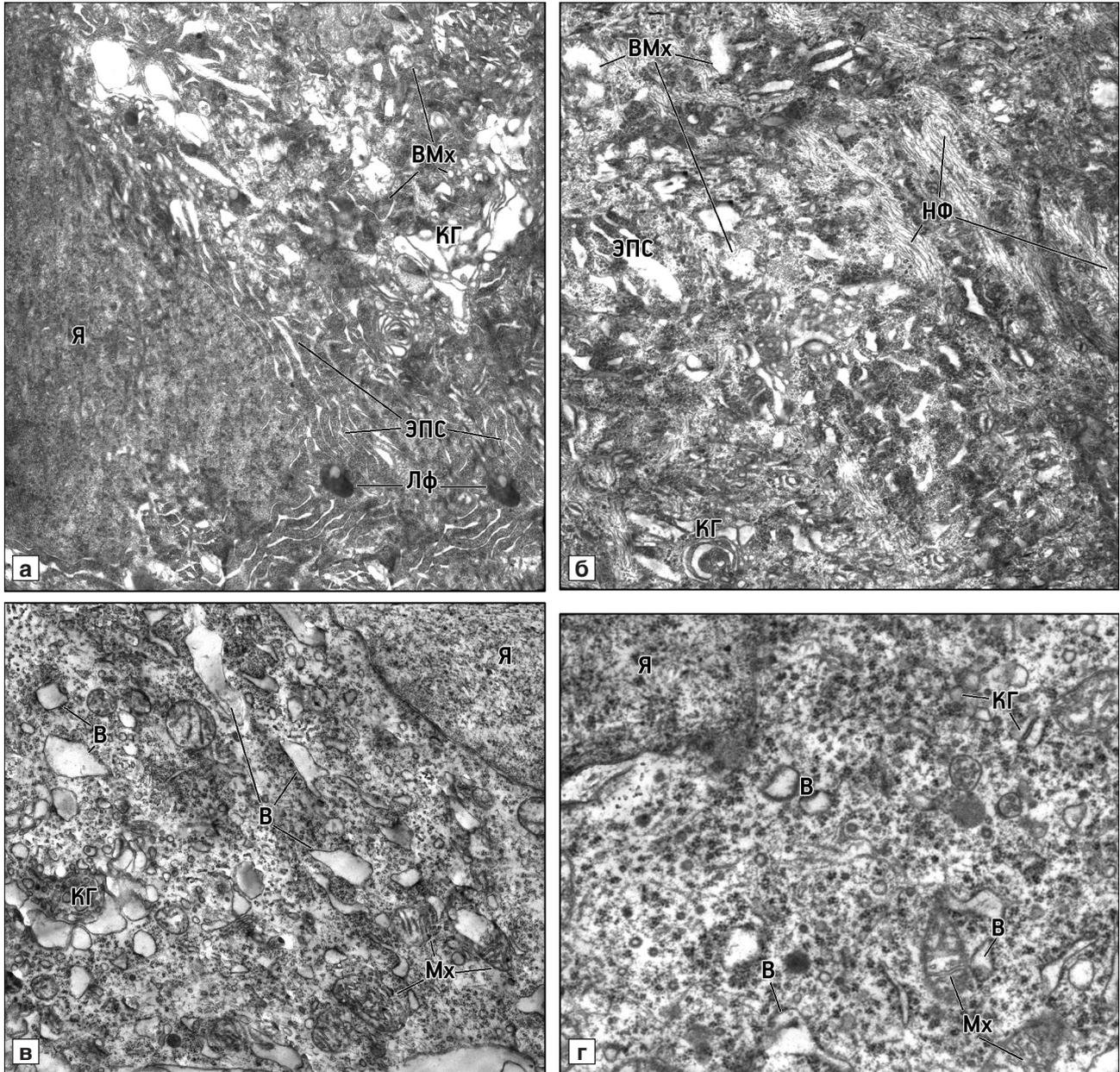


Рис. 2. Нейроны поясничных (а, в, г) и шейного (б) узлов спинномозговых нервов крыс с ишемической миелопатией без лечения (а) и после лечения повторяющейся магнитной стимуляцией (б–г).

а, б — гиперхромные нейроны; в — нейроны с признаками высокой функциональной активности; г — нейрон в состоянии внутриклеточной репарации. Я — ядро; ЭПС — каналцы гранулярной эндоплазматической сети; Лф — липофусциновые включения; КГ — комплекс Гольджи; Мх — митохондрии; ВМх — вакуолизованные митохондрии; НФ — нейрофиламенты; В — вакуолизованные каналцы гранулярной ЭПС. Ув.: а — 4000; б — 5000; в — 10 000; г — 16 000

У всех животных, леченных с помощью ПМС, визуально увеличивалось количество леммоцитов. Нередко наблюдались морфологические признаки восстановления их функциональной активности. Клетки имели ядра типичной структуры и полный набор органелл в цитоплазме (см. рис. 3, б).

Миелиновые волокна УСН у крыс без лечения характеризовались такими изменениями, как слипание пластинок миелина с потерей четкости структуры миелиновой оболочки, повышение ее осмиофилии, нарушение строения насечек миелина и узловых перехватов. Аксоны изменялись

значительно реже и в меньшей степени, чем миелиновая оболочка (рис. 4, а). В миелиновых волокнах как шейных, так и поясничных УСН после лечения ПМС, миелино- и аксонопатия были умеренно выраженными, а в единичных миелиновых волокнах выявлялась ремиелинизация (см. рис. 4, б).

Морфологические признаки восстановления структуры чувствительных УСН после терапии ИМ с помощью ПМС коррелировали с положительной динамикой клинических показателей. В частности, наблюдалось уменьшение двига-

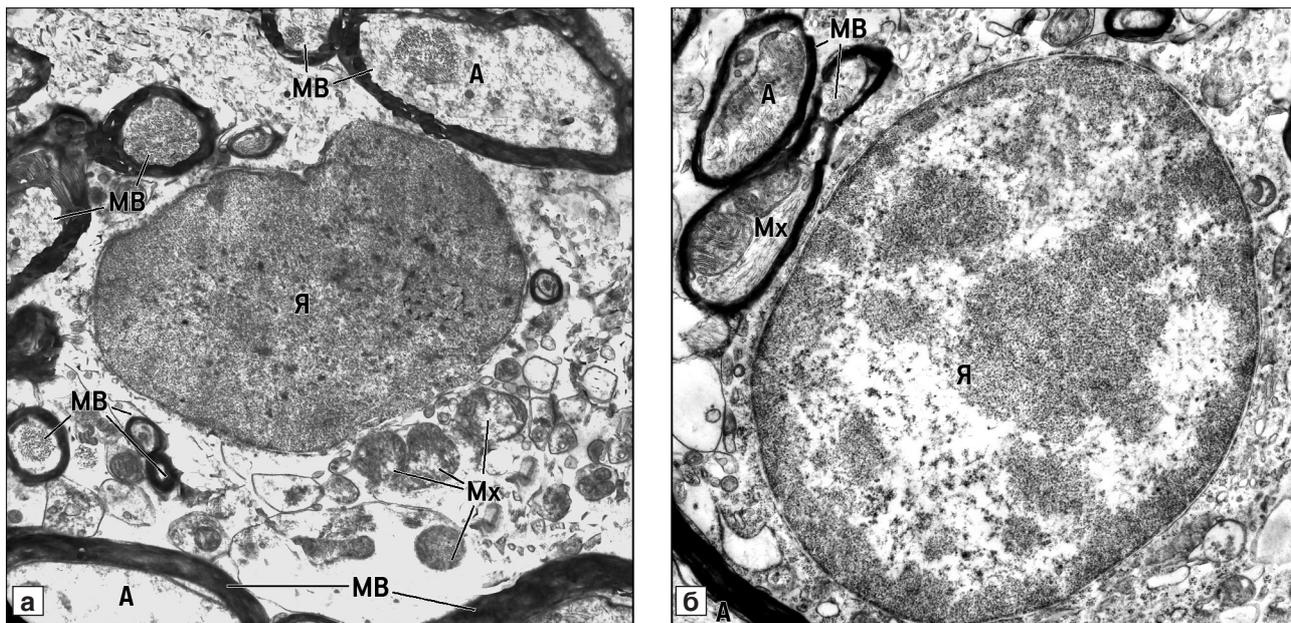


Рис. 3. Леммоциты поясничных узлов спинномозговых нервов крыс с ишемической миелопатией без лечения (а) и после лечения повторяющейся магнитной стимуляцией (б).

а — леммоцит с признаками дистрофии по светлomu типу; б — леммоцит с типичной структурой ядра и цитоплазмы и почти сохраненные миелиновые волокна. МВ — миелиновое волокно; А — аксон. Остальные обозначения те же, что на рис. 2. Ув.: а — 8000; б — 10 000

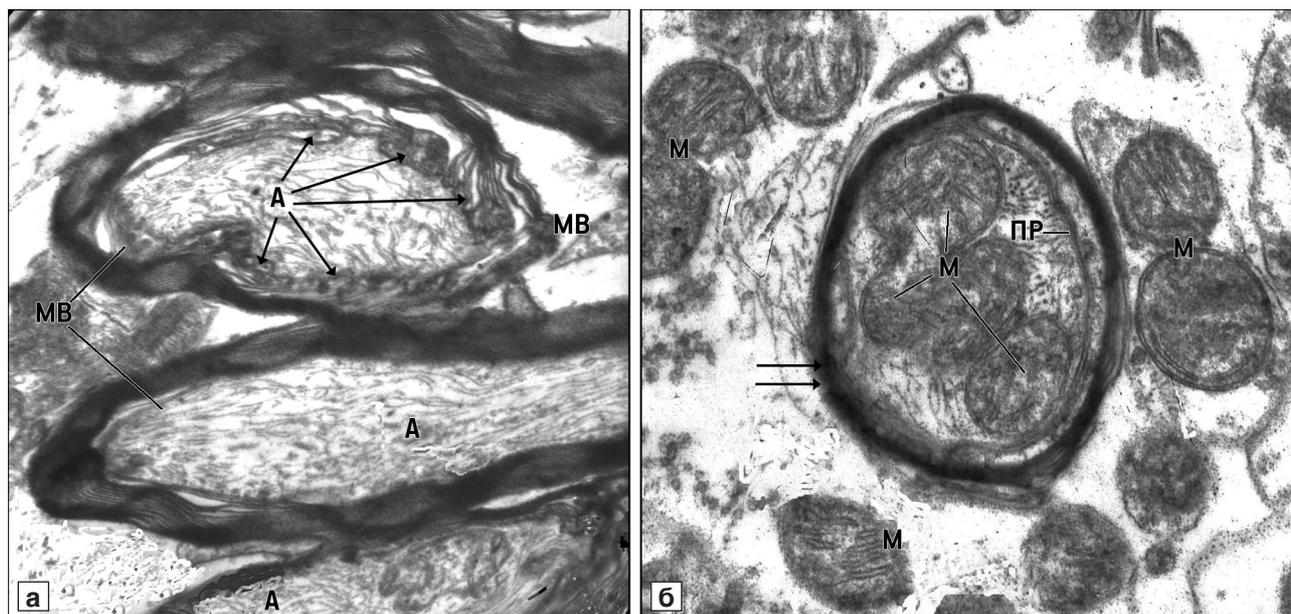


Рис. 4. Миелиновые волокна (МВ) шейных узлов спинномозговых нервов крыс с ишемической миелопатией без лечения (а) и после лечения повторяющейся магнитной стимуляцией (б).

А — аксон; М — митохондрии с сохраненной структурой. Стрелки — умеренно измененные насечки миелина; две стрелки — МВ с типичной структурой аксона и признаками ремиелинизации (ПР). Ув. 20 000

тельных расстройств, причем сила в задних лапах восстанавливалась не только при умеренной, но и при значительной выраженности нижнего парапареза. У всех животных 1-й группы с гипестезией, получавших лечение ПМС, отмечалось повышение реакций на болевое раздражение хвоста. Восстановление двигательных функций во 2-й группе сравнения (без лечения ПМС) было менее

значительным. Уменьшение выраженности пареза определялось у одной трети крыс, а регресс чувствительных расстройств — только у половины.

Обсуждение полученных данных. Значительное число исследований механизмов действия импульсного магнитного поля на структуры ЦНС посвящено влиянию транскраниальной магнитной стимуляции на клетки моторной коры.

В них доказано, что магнитные стимулы модулируют синаптическую активность клеток коры по типу долговременных депрессий или потенцииаций. Также рассматриваются и такие механизмы, как метапластичность, согласно которой предварительная высокая постсинаптическая активность клеток коры головного мозга увеличивает порог их активации и снижает порог ингибиции [5–7].

При электронно-микроскопическом исследовании в ряде нейронов и нейролеммоцитов чувствительных УСН у леченных ПМС животных нами были обнаружены морфологические признаки высокой функциональной активности. Кроме того, наблюдалось увеличение количества нейролеммоцитов, а в миелиновых волокнах при умеренно выраженной миелино- и аксонопатии выявлялись признаки ремиелинизации. Особенно важным было обнаружение в клетках УСН (как в нейронах, так и в нейролеммоцитах) крыс, получавших лечение ПМС, характерных морфологических признаков восстановления по типу внутриклеточной репарации. Такие структурные изменения позволяют предположить, что при проведении ПМС распространение импульса было опосредовано задними корешками спинномозговых нервов, а реализация лечебных эффектов осуществлялась через схожие с транскраниальной магнитной стимуляцией механизмы [6].

При ПМС у крыс с морфологическими изменениями в УСН наблюдается и более отчетливая положительная клиническая динамика. Такая чувствительность к стимуляции может служить косвенным подтверждением теории метапластичности. Для структурных элементов спинного мозга (нейронов, глиоцитов и нервных волокон) подобные факты были установлены ранее в аналогичных экспериментах [2].

Выбранная экспериментальная модель ИМ корректно воспроизводит поражение грудного отдела спинного мозга. Обнаружена высокая степень корреляции клинических и морфологических показателей. Показано, что экспериментальная сосудистая спинальная патология в восстановительном периоде без лечения может сопровождаться поражением клеток и других структур шейных и поясничных чувствительных УСН, а также миелиновых волокон в них в виде отчетливой миелинопатии и менее выраженной аксонопатии.

Таким образом, лечебное действие ПМС чувствительных УСН при ИМ проявляется отчетливым улучшением структуры всех их элементов. Схожесть механизмов терапевтических эффектов этого способа воздействия с транскраниальной модификацией метода дает возможность исполь-

зовать общие подходы при определении параметров стимуляции, упростит их подбор, что, в конечном итоге, позволит улучшить результаты лечения травматических и сосудистых поражений спинного мозга.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Акимов Г. А. и Семенова-Тян-Шанская В. В. Исследование патоморфологических изменений в нервной системе по методу Б. С. Дойникова. Арх. пат. 1953, т. 15, № 5, с. 82–86.
2. Искра Д. А. Периферическая деафферентация при очаговых поражениях центральной нервной системы (особенности патогенеза, клиники, диагностики и лечения двигательных расстройств): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2007.
3. Мионов А. А., Комиссарчик Я. Ю. и Мионов В. А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб., Наука, 1995.
4. Скоромец А. А., Тиссен Т. П., Панюшкин А. И. и Скоромец Т. А. Сосудистые заболевания спинного мозга. СПб., СОТИС, 1998.
5. Cardenas-Morales L. Nowak D. A. and Kammer T. et al. Mechanisms and applications of theta-burst rTMS on the human motor cortex. *Brain Topogr.*, 2010, v. 22, p. 294–306.
6. Ridding M. C. and Ziemann U. Determinants of the induction of cortical plasticity by non-invasive brain stimulation in healthy subjects. *J. Physiol.*, 2010, v. 588, № 13, p. 2291–2304.
7. Rossi S., Hallett M., Rossini P. M. and Pascual-Leone A. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin. Neurophysiol.*, 2009, v. 120, № 12, p. 2008–2039.
8. Tadahiko A. Microangiographic study of the influence of kyphosis on the system of anterior vertebral artery in cases of kyphosis in two-legged rats. *J. Korean med. soc.*, 1989, v. 20, № 1, p. 23–33.

Поступила в редакцию 11.06.2012

Получена после доработки 05.02.2013

#### STRUCTURAL CHANGES IN THE SENSORY GANGLIA OF THE SPINAL NERVES AFTER REPEATED MAGNETIC STIMULATION ON THE MODEL OF ISCHEMIC MYELOPATHY

*L. S. Onishchenko and D. A. Iskra*

The aim of this study was to examine the association of morphological changes in the sensory ganglia of the spinal nerves (SGSN) with the clinical symptomatology in rats with the experimentally induced ischemic myelopathy (IM), untreated or treated with repeated magnetic stimulation (RMS). The efficacy and mechanisms of RMS action on SGSN were studied by electron microscopy in 16 rats with IM. According to the results of treatment, in SGSN both at a distance from the damaged area (lumbar SGSN) and close to it (cervical SGSN) the morphological signs of regenerative-reparative processes were found in the cells and nerve fibers (restoration of the organelle structure in the cytoplasm of neurons and neurolemmocytes, the increase in the number of the latter and fiber remyelination).

The expression of the structural changes correlated with the degree of functional recovery.

**Key words:** *sensory ganglia of the spinal nerves, ischemic myelopathy, repeated magnetic stimulation, electron microscopy*

Department of Nervous Diseases, S. M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg