

ЩАНИЦЫН И. Н., ИВАНОВ А. Н.,
БАЖАНОВ С. П., УЛЬЯНОВ В. Ю.,
НОРКИН И. А., НИНЕЛЬ В. Г.,
ПУЧИНЬЯН Д. М.

Методы изучения изменений в спинном мозге при травматических повреждениях периферического нерва

Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
e-mail: sarniito@yandex.ru

Реферат

Согласно современным представлениям, травматические повреждения периферических нервов во всех случаях сопровождаются структурными и функциональными нарушениями состояния нейронов сегментарного аппарата спинного мозга. В начальной стадии травмы происходит вазодилатация сосудов спинного мозга и повышение проницаемости гематоспинального барьера на фоне нейрогенного воспаления и выброса активных веществ центральной частью С-волокна или активации моноцитов и Т-клеток. Эти изменения достигают максимума через 24 ч и сохраняются в течение 7 дней. В поздней стадии, на 3–5-й день после травмы, отмечаются структурные изменения задних и передних рогов. Важная роль в этих нарушениях принадлежит исчезновению ретроградного транспорта трофических факторов, нарушению гематоспинального барьера и изменению микроциркуляции в спинном мозге.

В литературе представлены лишь единичные исследования изменений гематоспинального барьера и микроциркуляции спинного мозга при травме периферических нервов. Более детальное изучение этой проблемы может помочь в решении ряда вопросов, среди которых — развитие дегенеративных процессов в спинном мозге при периферических нейропатиях, патогенез и лечение нейропатической боли, фармакокинетика лекарственных веществ на фоне повышения проницаемости гематоэнцефалического и гематоспинального барьера, влияние лекарственных препаратов и электромагнитной стимуляции на регенерацию периферических нервов и спинного мозга, прогнозирование динамики функционального состояния спинного мозга при поражении периферических нервов.

В статье представлены различные методы, которые могут помочь в исследовании патогенеза поражения нейронов спинного мозга при травме периферического нерва.

Ключевые слова: травма периферического нерва, микроциркуляция, спинной мозг, гематоспинальный барьер, спинальный кровоток, лазерная доплеровская флоуметрия.

Структурные и функциональные изменения спинного мозга при травме периферического нерва.

В начале XX в. уже было известно, что повреждение периферического нерва приводит к гибели нейронов спинного мозга [44]. В начальной стадии травмы происходит вазодилатация сосудов спинного мозга и повышение проницаемости гематоспинального барьера на фоне нейрогенного воспаления и выброса активных веществ (пептида Р, CGRP) центральной частью С-волокна или активации моноцитов и Т-клеток [37]. Эти изменения достигают максимума через 24 часа и сохраняются в течение 7 дней [46]. В поздней стадии, на 3–5-й день после травмы, отмечаются структурные изменения задних и передних рогов. Важная роль в этих нарушениях принадлежит исчезновению ретроградного транспорта трофических факторов [13].

Повреждение нервных волокон вызывает изменения в проксимальной части аксона, в «родительском»

нейроне и в нейронах, находящихся с ним в синаптической связи [7]. Ретроградные изменения могут распространяться выше «родительского» нейрона и на контралатеральную сторону вследствие трансинаптических связей.

Повреждение периферического нерва приводит к изменению структуры и функции чувствительной и двигательной «родительских» клеток (изменение размера тела клетки, ядра и ядрышка, распыление нислевских глыбок). Изменения включают отек клетки, фрагментацию аппарата Гольджи, вакуолизацию протоплазмы и смещение ядра к периферии клетки [3, 36]. Конечным результатом внутриклеточных дегенеративных изменений может быть некроз нейрона, полное восстановление или резидуальный дефект структурной единицы нервной системы.

Количество нейронов, погибающих в результате аксотомии, сильно варьирует по данным разных исследователей: от 7 до 50 % чувствительных нейронов и от 0 до 80 % мотонейронов [3, 10, 44].

ОБЗОР

Возможными причинами этого являются различный дизайн и методология исследований: видовые различия экспериментальных животных, различия в возрасте животных, различия в типе и локализации аксотомии, технические различия в оценке размеров, формы и количества нейронов [50]. Ретроградные изменения наиболее быстро и ярко протекают в чувствительных нейронах (особенно в малых клетках спинно-мозговых ганглиев), чем в двигательных [36].

McKay Hart et al. в своей работе детально исследовали гибель нейронов в спинном мозге при пересечении седалищного нерва в средней трети бедра крыс [25]. Гистологическое исследование спинно-мозговых ганглиев (L4–L5) проводилось через 1 и 4 дня, 1, 2, 4 и 6 месяцев после аксотомии. Гибель нейронов начиналась в течение 24 часов после аксотомии. Через 2 недели после травмы отмечалось поражение более 21 % нейронов, через 2 месяца отмечалась гибель 35 % нейронов. В дальнейшем значительных изменений не выявлено.

Триггером гибели нейронов при аксотомии могут являться антидромная электрическая активность, ретроградное влияние нейротоксических воспалительных агентов и потеря нейротрофического влияния [41]. Было показано, что нейротрофические медиаторы усиливают ангиогенез, вызывают вазодилатацию и увеличивают проницаемость микрососудов [51].

Капилляры спинного мозга содержат многочисленные эндотелиальные клетки, которые регулируют баланс жидкости и являются физиологическим фильтром между кровеносной системой и спинным

мозгом, т. е. гематоспинальным барьером [46]. Ранняя микрососудистая реакция после травмы периферического нерва приводит к нарушению гематоспинального барьера, что является критическим фактором в гибели нейронов [23].

В своем исследовании S. Beggs et al. показали, что травма седалищного нерва приводит к нарушению гематоспинального барьера. Изменения достигают максимальных значений через 24–48 часов после травмы и регрессируют в течение 7 дней. Изменения затрагивают не только поясничный отдел, но распространяются по всему спинному мозгу до головного мозга и приводят к нарушению гематоэнцефалического барьера [14].

Таким образом, изучение гематоспинального барьера и состояния микроциркуляции спинного мозга при травме периферического нерва представляет большой интерес для понимания механизмов изменений в его сегментарном аппарате. Более детальное изучение этой проблемы может помочь в решении ряда вопросов, среди которых развитие дегенеративных процессов в спинном мозге при периферических нейропатиях, патогенез и лечение нейропатической боли, фармакокинетика лекарственных веществ на фоне повышения проницаемости гематоэнцефалического и гематоспинального барьера, влияние лекарственных препаратов и электромагнитной стимуляции на регенерацию периферических нервов и спинного мозга, прогнозирование динамики функционального состояния спинного мозга при поражении периферических нервов.

Методы исследования микроциркуляции спинного мозга

Таблица

Морфологические методы исследования	Гистоморфологические методы исследования	Прямая микроскопия стенки сосуда; изучение микрососудистой архитектуры; прижизненная биомикроскопия; оценка плотности капилляров;
	Методы визуализации ангиоархитектоники	Рентгеновская ангиография; МР-ангиография; КТ-ангиография
Физиологические методы исследования	Ультразвуковая доплерография и доплерфлоуметрия	
	Лазерная флоуметрия	
	Перфузионные методы исследования (ауторадиография, ведение меченных микросфер, ПЭТ, МРТ, КТ)	
	Параинфракрасная спектроскопия	
	Полярографический метод	
	Инtrateкальное измерение давления кислорода	
	Метод регистрации температуры ткани	
	Измерение клиренса водорода	
	Фотоэлектрическая плетизмография	
	Метод регистрации изменения электрического сопротивления	
	Электрофизиологические методы исследования (ССВП, ДВП, СМВП, ЭНМГ)	
	Биохимические маркеры ишемии спинного мозга	

Методы исследования микроциркуляции спинного мозга

Морфологические методы исследования микроциркуляции. Для клинического и экспериментального исследования микроциркуляции применяют гистоморфологические методы исследования и методы визуализации ангиоархитектоники.

К гистоморфологическим методам исследования можно отнести прямую микроскопию стенки сосудов, изучение микрососудистой архитектуры, прижизненную биомикроскопию, оценку плотности капилляров, иммуногистохимические методы.

Прямая микроскопия стенки сосудов выполняется при помощи световой и электронной микроскопии [8, 30, 42] (рис. 1). Для изучения микрососудистой архитектуры спинного мозга применяют различные методы заливки и окрашивания сосудов: метод заливки сосудов полиэфирной маловязкой смолой [18], инъекция суспензии сажи [29], микроангиография [20] (рис. 2).

Метод визуального наблюдения терминального кровотока с использованием прижизненной биомикроскопии позволяет исследовать реактивность микроциркуляторного русла. Биомикроскопия дает

возможность объективно оценить параметры микрососудистого русла спинного мозга, такие как структура и диаметр микрососудов, состояние их тонуса, выявить различные внутрисосудистые изменения в естественных условиях заполнения сосудов кровью.

В настоящее время для исследования микрососудов спинного мозга с успехом применяются различные модификации биомикроскопии, проводится регистрация изучаемых процессов с помощью фотографирования, телевизионной биомикроскопии, киносъемки, видеозаписи и компьютерного анализа [19] (рис. 3).

Плотность и диаметр капилляров определяют проходимость и кровенаполнение микроциркуляторного русла спинного мозга и являются наиболее лабильными параметрами. Для оценки плотности капилляров применяют различные иммуногистохимические методы: метод окрашивания щелочной фосфатазой [55], инъекцию флуоресцентных декстрана или плазмы [16], инъекцию Эванс синего [54], ФИТЦ (флуоресцеин-5-изотиоцианат) [15] и других красителей (рис. 4). Иммуногистохимические методы визуализации микрососудов спинного мозга дают очень детальное изображение, но лишь нескольких срезов

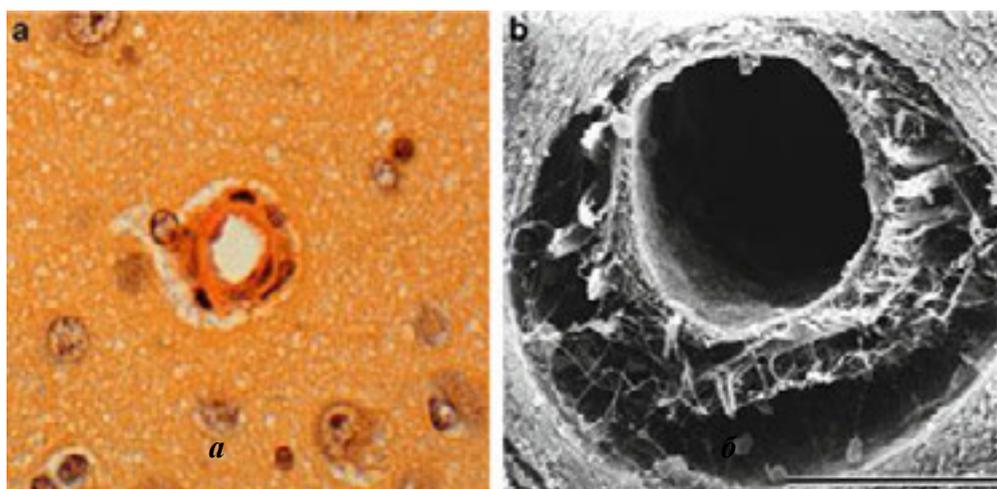


Рис. 1. Световая (а) и электронная (б) микроскопия артериол паренхимы спинного мозга собаки [42].

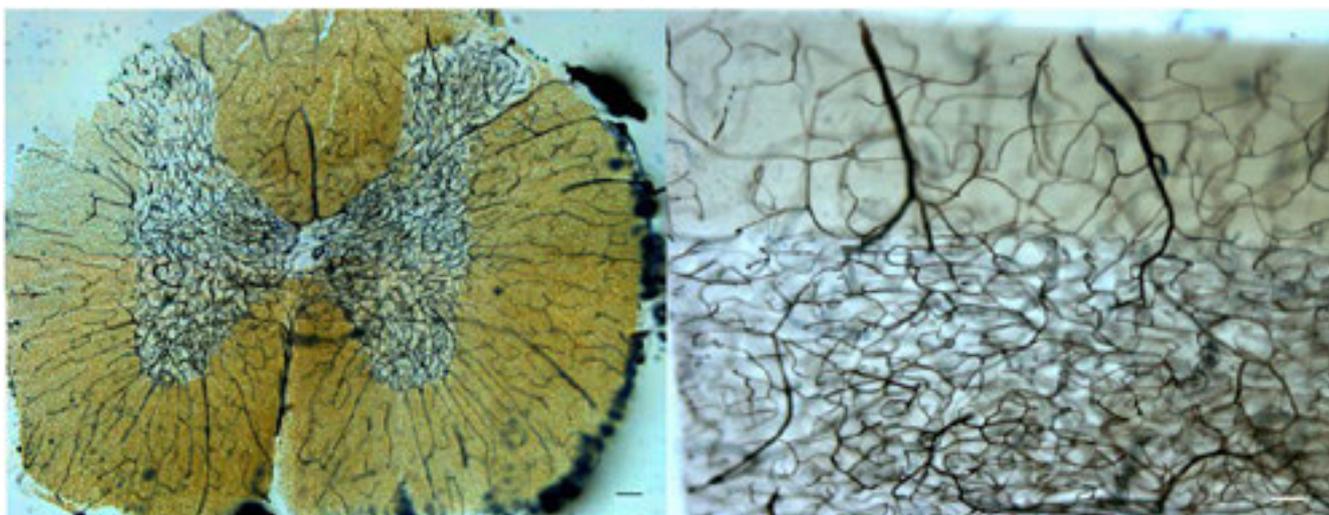


Рис. 2. Гистоморфологическое исследование микроциркуляции спинного мозга [27].

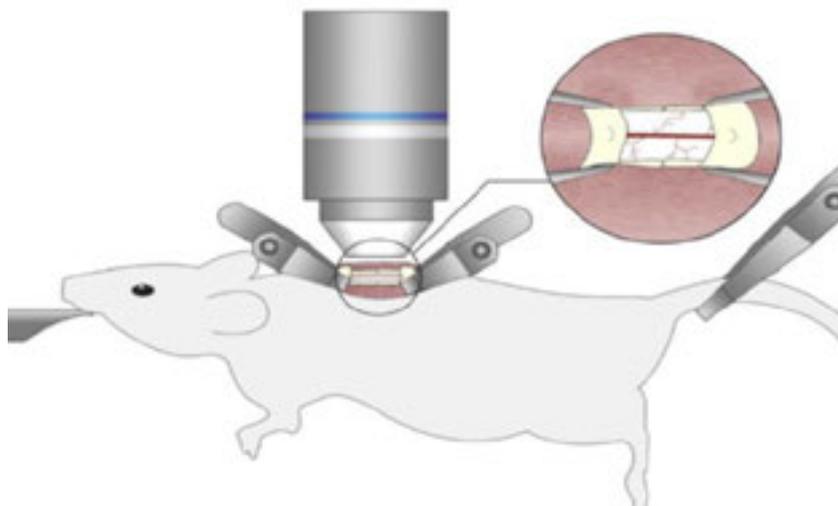


Рис. 3. Прижизненная биомикроскопия спинного мозга [19].

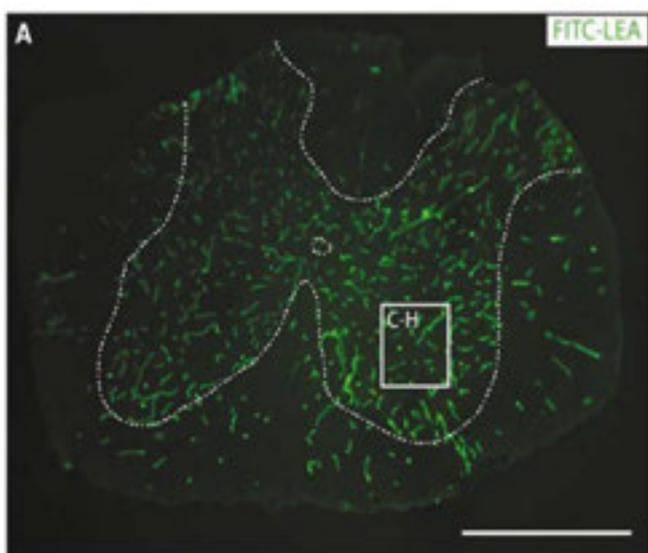


Рис. 4. Флуоресцентная микроскопия спинного мозга с применением ФИТЦ [15].

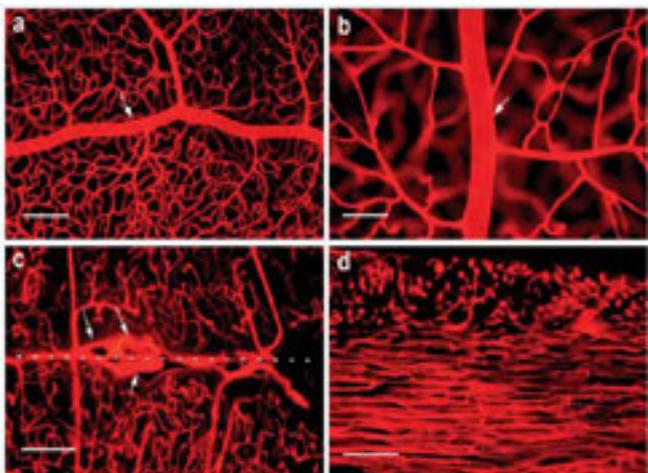


Рис. 5. Иммуногистохимический метод оценки микроциркуляции. Трехмерная реконструкция при флуоресцентной микроскопии [33].

сосудов. Предложенные методы окраски сосудов и флуоресцентной микроскопии позволяют создавать трехмерные реконструкции сосудов с глубиной 850 мкм [39] (рис. 5).

«Золотым стандартом» изучения спинальной ангиоархитектоники является рентгеновская селективная ангиография. Методика требует использования дорогостоящей техники, выполнения инвазивного вмешательства и введения контрастного вещества, при этом возможны осложнения, связанные как с техникой катетеризации, так и с реакцией на вводимые контрасты. По этой причине метод в настоящее время применяется в основном в экспериментальных исследованиях. На сегодняшний день предпочтение отдается использованию МР-ангиографии и КТ-ангиографии как более безопасным и эффективным методам, позволяющим оценить кровоснабжение спинного мозга (спинальные артерии, радикуломедуллярные артерии и их коллатерали) и венозный отток от него [45]. Однако стандартные методы ангиографии не позволяют визуализировать сосуды диаметром менее 200 мкм. Для изучения микроангиоархитектоники предложен метод, основанный на линейно-фазовой контрастной компьютерной томографии (synchrotron radiation-based x-ray in-line phase contrast computed tomography, IL-ХРСТ) [27].

При использовании IL-ХРСТ есть возможность изучения нейрососудистой морфологии без использования контрастных веществ. Разрешающая способность IL-ХРСТ — до 10 мкм. Данный метод можно использовать для изучения нейроангиогенеза и регенерации нервной ткани (рис. 6).

Физиологические методы исследования микроциркуляции и оценка функционального состояния спинного мозга

Помимо прямых методов оценки микроциркуляции, предложены различные физиологические методы, которые позволяют судить о кровотоке, газообмене и метаболизме на уровне микроциркуляторного русла (таблица). Описаны различные способы прямой ультразвуковой оценки кровоснабжения спинного мозга [40]. Кроме того, предложены

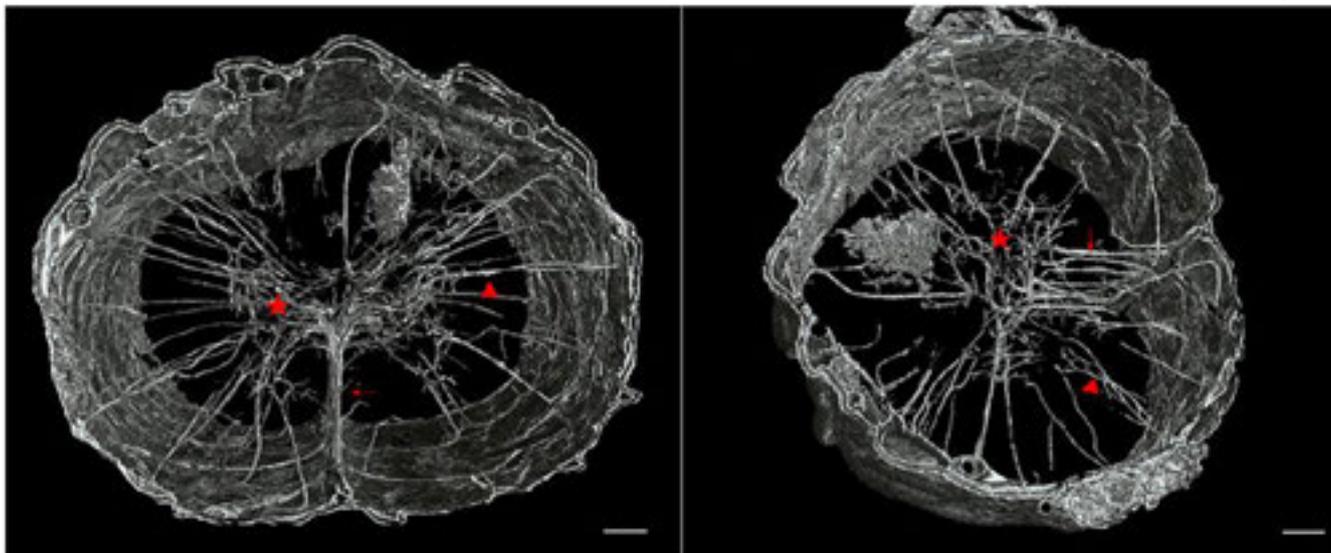


Рис. 6. 3D-микроангиоархитектоника спинного мозга крысы, полученная с применением IL-XPCT [27].

методы косвенной оценки гемодинамики спинного мозга с применением ультразвукового исследования кровотока в сегментарных артериях при травме позвоночника [1], гемангиомах позвоночника [6] и патологии аорты [31]. Предложенные ультразвуковые методы не позволяют напрямую оценить изменения микроциркуляции. Поэтому в настоящее время широко используется ультразвуковой и лазерный доплеровские датчики для исследования микроциркуляции и перфузии мелких кровеносных сосудов. Ультразвуковая доплерография позволяет определить линейную и объемную скорости кровотока [4].

Для оценки состояния капиллярного кровотока и его мониторинга в условиях эксперимента и клинической практики широко применяется метод лазерной доплеровской флоуметрии (лазерной низкочастотной спектроскопии) [22]. Метод основан на зондировании ткани лазерным излучением. Обработка исходящего от ткани излучения основана на выделении из зарегистрированного сигнала доплеровского сдвига частоты отраженного сигнала. Отраженный от ткани сигнал пропорционален количеству и скорости движения эритроцитов в кровеносном русле, а также количеству капилляров. В отличие от ультразвуковых методов диагностики, основанных на эффекте Доплера, при применении коротковолнового зондирующего лазерного излучения возможно получение отраженного сигнала наибольшей амплитуды от отдельных эритроцитов из более тонкого слоя ткани [5]. В условиях эксперимента на белых крысах установлено, что в остром периоде механической травмы спинного мозга лазерная доплеровская флоуметрия является эффективным методом для оценки микроциркуляции спинного мозга [8]. При интраоперационном мониторинге состояния микроциркуляции спинного мозга, его оболочек и корешков методом лазерной доплеровской флоуметрии у больных с позвоночно-спинно-мозговой травмой выявлено снижение объемного капиллярного кровотока в зоне сдавления [12]. P. J. Lindsberg et al. в эксперименте на кроликах показали, что лазерная доплеровская флоуметрия — чувствительный, стабильный и вос-

производимый метод оценки микроциркуляции, который позволяет выявлять даже незначительные изменения кровотока в спинном мозге [34].

Метод лазерной флоуметрии также позволяет оценить изменения микроциркуляции в нервной ткани. Ультрафиолетовое лазерное излучение возбуждает флуоресценцию различных ферментов (НАД-никотинамид-аденин-динуклеотид, флавины, липофусцин, порфирины и др.), что позволяет определить их содержание в тканях [38]. Simonovich M. et al. предложили устройство для одновременного исследования лазерной флуоресцентной флоуметрии (изучение концентрации кофермента НАД) и лазерной доплеровской флоуметрии в спинном мозге [48].

Изучению перфузии спинного мозга с использованием радиоактивных препаратов посвящено небольшое число исследований на животных. Вследствие высокой инвазивности, эти методы не подходят для исследования перфузии спинного мозга у человека. Применяются методы ауторадиографии [14] с антипирином [26], метод ведения меченных микросфер с радиоактивными изотопами (^{131}I , ^{85}Sr , ^{109}Yb) [52].

Кроме того, для оценки метаболических изменений применяют позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ). Изменение метаболизма может быть ранним показателем вазоспазма сосудов и нарушения микроциркуляции [17].

Однако ПЭТ является дорогим и малодоступным методом. Для оценки перфузии спинного мозга человека необходимо, чтобы метод был минимально инвазивным, имел высокое разрешение и не требовал длительного исследования. Применение перфузионных программ при КТ и МРТ значительно расширило возможности изучения микроциркуляции спинного мозга [17].

Параинфракрасная спектроскопия является неинвазивным способом оценки регионарной оксигенации мозга. Метод основан на определении интенсивности параинфракрасного излучения, проходящего через ткани. Метод в настоящее время стал широко применяться для определения насыщения

ОБЗОР

кислородом головного мозга при каротидной энтерэктомии. Экспериментальные работы показали возможность применения метода для определения ишемии спинного мозга [32].

Полярографический метод позволяет определять напряжение кислорода в ткани мозга путем имплантации полярографического электрода в вещество мозга. Метод основан на превращении молекулярного кислорода, растворенного в электролитном растворе, в гидроксильные ионы. Эта химическая реакция, протекающая вблизи полярографического катода, вызывает появление электрического тока, величина которого прямо пропорциональна диффузии молекулярного кислорода, через мембрану электрода из окружающих тканей. В эксперименте была показана эффективность полярографического метода для мониторинга кровотока в спинном мозге [28].

Постоянное измерение давления кислорода, диоксида углерода и рН в спинно-мозговой жидкости интратекальным датчиком — высокочувствительный и легкий в применении метод мониторинга состояния спинного мозга. В экспериментальных работах выявлена корреляция изменений кровотока в спинном мозге (лазерная флоуметрия), двигательных вызванных потенциалов и ультраструктурных изменений (электронная микроскопия) с изменениями уровня давления O_2 , CO_2 и рН в ликворе [35].

Метод измерения теплового клиренса основан на предположении, что каждое регистрируемое повышение температуры спинного мозга соответствует локальному увеличению спинального кровотока [43]. R. Wullenweber в 1968 г. применил этот метод для определения спинального кровотока у человека [56].

Y. Suzuki et al. в эксперименте подтвердили эффективность метода измерения клиренса водорода для определения кровотока в спинном мозге [49]. При измерении водородного клиренса в мозг вживляют ряд металлических электродов для регистрации сдвига электрохимического потенциала, который создается подкислением тканей ионами водорода. По его уровню судят о перфузии спинного мозга.

В основу фотоэлектрической плетизмографии положен принцип изменения объема в измеряемом участке за счет динамического увеличения или уменьшения количества крови, связанного с фазами сердечного цикла.

Метод фотоплетизмографии основан на регистрации оптической плотности исследуемой ткани [11].

Метод регистрации изменения электрического сопротивления основан на измерении электрического тока пучком электродов, имплантированных в спинной мозг. Изменения электрического сопротивления,

обусловленные пульсовыми колебаниями кровенаполнения при каждом сердечном сокращении, зависят от притока-оттока, а также от скорости кровотока, которая, в свою очередь, связана с тонусом сосудов и их эластичностью. Метод позволяет получить показатели интенсивности кровенаполнения, состояния тонуса мозговых сосудов и венозного оттока [47].

Ишемия спинного мозга приводит к угнетению проведения нервного импульса. Таким образом, для косвенной оценки нарушения микроциркуляции применимы электрофизиологические методы исследования [24, 55].

При изучении вызванных потенциалов оценивается состояние чувствительных и двигательных путей проведения спинного мозга. Применяются три основные методики: регистрация соматосенсорных вызванных потенциалов, вызванных потенциалов спинного мозга и двигательных вызванных потенциалов. Регистрация и анализ F-волны и H-рефлекса при электронейромиографическом (ЭНМГ) исследовании позволяют судить о заинтересованности корешков и мотонейронов передних рогов спинного мозга при различной его патологии [21].

Ишемия нервной ткани сопровождается метаболическими нарушениями и приводит к изменению уровня биохимических маркеров в биологических жидкостях. В экспериментальных и клинических работах исследуются различные маркеры ишемии: нейроспецифические белки (белок S100, глиальный фибриллярный кислый протеин, нейронспецифическая энолаза, нейрофиламенты); нейромедиаторы (глутамат, аспартат, глицин); показатели метаболического обмена (лактат, лактатдегидрогеназа); показатели оксидативного стресса (свободные радикалы, белки теплового шока) [2].

Вывод

Травматические повреждения периферических нервов сопровождаются структурными и функциональными нарушениями спинного мозга. В патогенезе этих нарушений большую роль играет изменение кровообращения. Поэтому изучение состояния микроциркуляции спинного мозга при травме периферического нерва является актуальной темой для исследований.

Предложено множество морфологических и функциональных методов, позволяющих напрямую или косвенно оценить кровообращение спинного мозга. Применение различных методов изучения спинальной микроциркуляции может помочь в изучении патогенеза травмы и процессов регенерации периферического нерва.

Литература

1. Афонин Д. Н., Афонин П. Н. Допплерографическое исследование кровотока в сегментарных артериях при стенозе позвоночного канала // Вестник новых мед. техн. 2001. № 8 (4). С. 75–77.
2. Бокерия Л. А., Аракелян В. С., Щаницын И. Н. и др. Нейромониторинг состояния спинного мозга при операциях на аорте // Анналы хирургии. 2012. № 4. С. 40–45.
3. Живолупов С. А., Рашидов Н. А., Самарцев И. Н. и др. Современные представления о регенерации нервных волокон при травмах периферической нервной системы // Вестник Российской Военно-мед. акад. 2013. № 3 (43). С. 190–198.
4. Иванов А. Ю. и др. Возможности контроля кровотока при нейрохирургических операциях с помощью аппарата «Минимакс» // Методы исследования регионарного кровообращения и микроциркуляции в клинике: Материалы науч.-практ. конф. СПб., 2004. С. 30–31.
5. Крупаткин А. И., Сидоров В. В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность: рук-во для врачей. М.: Либроком, 2013. 496 с.
6. Лихачев С. В., Щаницын И. Н., Шелудякова Н. Б. и др. Особенности регионарного кровотока у больных с гемангиомами позвоночника // Материалы IV съезда Межрегиональной общественной организации «Ассоциация хирургов-вертебрологов». 2013. С. 79–81.
7. Нечипуренко Н. И. Современные представления о патогенезе травматических поражений периферических нервов // Мед. новости. 1997. № 5. С. 9–16.
8. Нинель В. Г., Норкин И. А., Пучиньян Д. М. и др. Гистоморфологическая оценка эффективности воздействия переменного магнитного поля и импульсного тока на регенерацию седалищного нерва крыс в эксперименте // Фундамент. исслед. 2012. № 12 (2). С. 336–340.
9. Степанов Г. А., Крупаткин А. И., Моргунов А. Ю. Оценка микроциркуляции спинного мозга при его острой экспериментальной травме с помощью лазерной доплеровской флоуметрии // Вестник травматол. и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2005. № 2. С. 29–32.
10. Тимофеева Л. Б., Благова Н. В., Величанская А. Г. и др. Динамика количества чувствительных и моторных нейронов, участвующих в регенерации седалищного нерва крысы после его перерезки // Морфолог. ведомости. 2011. № 1. С. 52–57.
11. Тиходеев С. А., Иванова Т. Н. Новый способ регистрации спинального кровообращения при заболеваниях и травмах позвоночника // Вестник хирургии. 1995. № 154 (4–6). С. 83–85.
12. Щурова Е. Н., Худяев А. Т. Исследование микроциркуляции спинного мозга с помощью лазерной доплеровской флоуметрии у больных с острой позвоночно-спинномозговой травмой // Методология флоуметрии. 2001. № 5. С. 77–86.
13. Ambron R. T., Walters E. T. Priming events and retrograde injury signals. A new perspective on the cellular and molecular biology of nerve regeneration // Mol. Neurobiol. 1996. № 13. P. 61–79.
14. Beggs S., Liu X. J., Kwan C. et al. Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier // Mol. Pain. 2010. № 2 (6). P. 74.
15. Benton R. L., Maddie M. A., Worth C. A. et al. Transcriptomic screening of microvascular endothelial cells implicates novel molecular regulators of vascular dysfunction after spinal cord injury // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 2008. № 28 (11). P. 1771–1785.
16. Buchweitz E., Weiss H. Alterations in perfused capillary morphometry in awake vs anesthetized brain // Brain. Res. 1986. № 377. P. 105–111.
17. Carlson A. P., Yonas H. Radiographic assessment of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: the physiological perspective // Neurol. Res. 2009. № 31. P. 593–604.
18. Daneyemez M. Silicone rubber microangiography of injured acute spinal cord after treatment with methylprednisolone and vitamin E in rats // Spine (Phila Pa 1976). 1999. № 24 (21). P. 2201–2205.
19. Davalos D., Lee J. K., Smith W. B. et al. Stable in vivo imaging of densely populated glia, axons and blood vessels in the mouse spinal cord using two-photon microscopy // J. Neurosci. Methods. 2008. № 169 (1). P. 1–7.
20. Fairholm D. J., Turnbull I. M. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries // J. Neurosurg. 1971. № 35 (3). P. 277–286.
21. Fisher M. A. AAEM Minimonograph #13: H reflexes and F waves: physiology and indications // Muscle and Nerve. 1992. № 15. P. 1223–1233.
22. Frerichs K. U., Feuerstein G. Z. Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow // Mol. Chem. Neuropathol. 1990. № 12 (1). P. 55–70.
23. Gordh T., Sharma H. S. Chronic spinal nerve ligation induces microvascular permeability disturbances, astrocytic reaction, and structural changes in the rat spinal cord // Acta. Neurochir. Suppl. 2006. № 96. P. 335–340.
24. Guerit J. M., Verhelst R., Rubayetal J. Multilevel somatosensory evoked potentials (SEPs) for spinal cord monitoring in descending thoracic and thoraco-abdominal aortic surgery // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 1996. № 10. P. 93–103.
25. Hart M. A., Brannstrom T., Wiberg M. et al. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination // Exp. Brain. Res. 2002. № 142 (3). P. 308–318.
26. Holtz A., Nystrom B., Gerdin B. Regulation of spinal cord blood flow in the rat as measured by quantitative autoradiography // Acta. Physiol. Scand. 1988. № 133. P. 485–493.
27. Hu J. Z., Wu T. D., Zeng L. et al. Visualization of microvasculature by x-ray in-line phase contrast imaging in rat spinal cord // Phys. Med. Biol. 2012. № 57 (5). P. 55–63.
28. Hukuda S., Amano K. Spinal cord tissue oxygen in experimental ischemia, compression, and central necrosis // Spine. Iphila. Pa. 1976. № 5 (4). P. 303–306.
29. Kato A., Ushio Y., Hayakawa T. et al. Circulatory disturbance of the spinal cord with epidural neoplasm in rats // J. Neurosurg. 1985. № 63 (2). P. 260–265.
30. Koyanagi I., Tator C. H., Lea P. J. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 1: Normal spinal cord // Neurosurgery. 1993. № 33 (2). P. 277–283.
31. Koyanagi T., Kawaharada N., Kurimoto Y. Examination of Intercostal Arteries with Transthoracic Doppler Sonography // Echocardiography. 2009. № 1. P. 17–20.
32. LeMaire S. A., Undar A., Junkerman J. et al. Use near-infrared spectrophotometry to monitor spinal cord oxygenation during intercostal artery ligation: preliminary experimental results // Ann. Thorac. Surg. 2002. № 73. P. 375.
33. Li Y., Song Y., Zhao L. et al. Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye

DiI // *Nat. Protoc.* 2008. № 3 (11). P. 1703–1708.

34. Lindsberg P. J., Jacobs T. P., Frerichs K. U. et al. Laser-Doppler flowmetry in monitoring regulation of rapid microcirculatory changes in spinal cord // *Am. J. Physiol.* 1992. № 263. P. 89–92.

35. Lips J., de Haan P., Bouma G. J. et al. Continuous monitoring of cerebrospinal fluid oxygen tension in relation to motor evoked potentials during spinal cord ischemia in pigs // *Anesthesiology*. 2005. № 102 (2). P. 340–345.

36. Ma J., Novikov L. N., Wiberg M. et al. Delayed loss of spinal motoneurons after peripheral nerve injury in adult rats: A quantitative morphological study // *Exp. Brain Res.* 2001. № 139. P. 216–223.

37. Madiati F., Hussain S. R., Goettl V. M. et al. Upregulation of FGF-2 in reactive spinal cord astrocytes following unilateral lumbar spinal nerve ligation // *Exp. Brain Res.* 2003. № 148 (3). P. 366–376.

38. Mayevsky A., Frank K., Muck M. et al. Multiparametric evaluation of brain functions in the Mongolian gerbil in vivo // *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 1992. № 3. P. 323–342.

39. Moy A. J., Wiersma M. P., Choi B. Optical histology: a method to visualize microvasculature in thick tissue sections of mouse brain. *PLoS // One*. 2013. № 8 (1). P. 537–553.

40. Nanai B., Lyman R., Bichsel P. S. Use of intraoperative ultrasonography in canine spinal cord lesions // *Vet. Radiol. Ultrasound*. 2007. № 48 (3). P. 254–261.

41. Novikova L., Novikov L., Kellerth J.-O. Brain derived neurotrophic factor reduces necrotic zone and supports neuronal survival after spinal cord hemisection in adult rats // *Neurosci. Lett.* 1996. № 220. P. 203–206.

42. Ohkuma H., Itoh K., Shibata S. et al. Morphological changes of intraparenchymal arterioles after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs // *Neurosurgery*. 1997. № 41. P. 230–236.

43. Pallese H., Herrmann H. D. Experimental investigation on the regulation of the blood flow of the spinal cord. I. Comparative study of the cerebral and spinal cord blood flow with heat clearance probes in pigs // *Acta. Neurochir. (Wien)*. 1968. № 19. P. 73–80.

44. Ranson S. W. Alterations in the spinal ganglion cells following neurotomy // *J. Comp. Neurol. Psychol.* 1909. № 19. P. 125–153.

45. Santillan A., Nacarino V., Greenberg E. et al. Vascular anatomy of the spinal cord // *J. Neurointerv. Surg.* 2012. №

4 (1). P. 67–74.

46. Sharma H. S. Early microvascular reactions and blood-spinal cord barrier disruption are instrumental in pathophysiology of spinal cord injury and repair: novel therapeutic strategies including nanowired drug delivery to enhance neuroprotection // *J. Neural. Transm.* 2011. № 118 (1). P. 155–176.

47. Shieff C., Vieira J. F., Nashold B. S. Jr. et al. Electrical impedance recording for localization in functional neurosurgery of the spinal cord and lower brain stem // *Acta. Neurochir. Suppl. (Wien)*. 1987. № 39. P. 174–176.

48. Simonovich M., Barbiro-Michaely E., Mayevsky A. Real-time monitoring of mitochondrial NADH and microcirculatory blood flow in the spinal cord // *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008. № 33 (23). P. 2495–2502.

49. Suzuki Y. Changes of microcirculation dynamics in the formation of edema following spinal compression injury in rabbits // *Nihon. Seikeigeka. Gakkai. Zasshi*. 1985. № 59 (7). P. 707–718.

50. Tandrup T., Woolf C. J., Coggeshall R. E. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve // *J. Comp. Neurol.* 2000. № 422 (2). P. 172–180.

51. Tang J., Hua Y., Su J. et al. Expression of VEGF and neural repair after alprostadil treatment in a rat model of sciatic nerve crush injury // *Neurol. India*. 2009. № 57. P. 387–394.

52. Tschetter T. H., Klassen A. C., Resch J. A. et al. Blood flow in the central and peripheral nervous system of dogs using a particle distribution method // *Stroke*. 1970. № 1 (5). P. 370–374.

53. Tsvetovskiy S. B., Stupak V. V. Monitoring of Spinal Cord Functional Status in Patients with Intramedullary Tumors // *Spine Surgery: Digest*. 2013. № 1. P. 1–10.

54. Vogel J., Hermes A., Kuschinsky W. Evolution of microcirculatory disturbances after permanent middle cerebral artery occlusion in rats // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 1999. № 19. P. 1322–1328.

55. Weiss H. R. Measurement of cerebral capillary perfusion with a fluorescent label // *Microvasc. Res.* 1988. № 36. P. 172–180.

56. Wullenweber R. «Itracerebral steal» in man recorded by a heat clearance technique // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968. № 102. P. XIII.

UDK 616.833-001:616.8

Shchanitsyn I. N., Ivanov A. N., Bajanov S. P., Ulyanov V. J., Norkin I. A., Ninel V. G., Puchinyan D. M.

Methods for studying changes in the spinal cord after traumatic injuries of peripheral nerves

Saratov Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics Ministry of Public Health
e-mail: sarniito@yandex.ru

Abstract

According to modern concepts, traumatic injuries of peripheral nerves are accompanied with structural and functional disorders of the spinal neurons in all cases. In an initial stage of injury there is vessel vasodilation of spinal cord and increase of permeability of the blood-spinal barrier. This stage is also characterized by neurogenic inflammation and output of active substances from the central part of fibers, or activation of monocytes and T cells. These changes reach their maximum in 24 hours and stay intact during 7 days. In a later stage, 3–5th day after the injury, structural changes are observed in the anterior and posterior horns. Disappearance of retrograde transport of trophic factors, disruption of blood-spinal cord barrier and change of microcirculation of the spinal cord play important role in these disorders.

There are only a few studies of changes of blood-cerebrospinal barrier and microcirculation of the spinal cord after peripheral nerve injury in the literature. A more detailed study of this problem can help to solve some of questions, such

as the development of degenerative changes in the spinal cord, the pathogenesis and treatment of neuropathic pain, the pharmacokinetics of medications on the background of increase of the permeability of blood-brain and blood-cerebrospinal barrier, the influence of the medications and electromagnetic stimulation effect on the regeneration of peripheral nerves and spinal cord, prediction of dynamics of functional state of patients with lesions of the peripheral nerves.

This article presents different methods that can help in the study of neuronal damage pathogenesis of the spinal cord injury after peripheral nerve injury.

Keywords: peripheral nerve injury, microcirculation, spinal cord, blood-spinal cord barrier, spinal blood flow, Laser Doppler flowmetry.

References

1. Afonin D.N., Afonin P.N. Dopplerograficheskoe issledovanie krovotoka v segmentarnykh arteriyah pri stenozе pozvonochного kanala // Vestnik novykh med. tehnol. 2001. No 8 (4). p. 75–77. [Doppler research of blood flow in segmentary arteries at stenosis of the vertebral channel]. [In Russian].
2. Bokerija L. A., Arakeljan V. S., Shhancyn I. N. et al. Nejromonitoring sostojanija spinного mozga pri operacijah na aorte // Annaly hirurgii. 2012. No 4. P. 40–45. [Spinal cord neuromonitoring during aortic surgeries]. [In Russian].
3. Zhivolupov S.A., Rashidov N. A., Samarcev I. N. et al. Sovremennye predstavlenija o regeneracii nervnykh volokon pri travmah perifericheskoy nervnoj sistemy // Vestnik Rossijskoj Voenno-med. akad. 2013. No 3 (43). p. 190–198. [Peculiarities of development of denervation-reinervation process in traumatic neuropathies and plexopathies]. [In Russian].
4. Ivanov A. Ju. et al. Vozmozhnosti kontrolja krovotoka pri nejrohirurgicheskikh operacijah s pomoshh'ju apparata «Minimaks» // Metody issledovanija regionarnogo krovoobrashhenija i mikrocirkuljacii v klinike: Materialy nauch.-prakt. konf. Saint-Petersburg. 2004. p. 30–31. [Possibilities of blood flow control at neurosurgical operations with the help of the device «Minimax»]. [In Russian].
5. Krupatkin A. I., Sidorov V.V. Funkcional'naja diagnostika sostojanija mikrocirkuljatorno-tkanevykh sistem: kolebanija, informacija, nelinejnost': ruk-vo dlja vrachej. M.: Librokom, 2013. 496 p. [Functional diagnostics of microcirculatory tissue systems: fluctuations, information, nonlinearity]. [In Russian].
6. Lihachev S.V., Shhancyn I.N., Sheludjakova N.B. et al. Osobennosti regionarnogo krovotoka u bol'nykh s gemangiomami pozvonochnika // Materialy IV s'ezda Mezhtselevoj obshhestvennoj organizacii «Associacija hirurov-vertebologov». 2013. p. 79–81. [Features of a regional blood flow at patients with hemangiomas of spinal cord]. [In Russian]. [In Russian].
7. Nechipurenko N.I. Sovremennye predstavlenija o patogeneze travmaticheskikh porazhenij perifericheskikh nervov // Med. novosti. 1997. No 5. P. 9–16. [Modern concept of pathogenesis of traumatic injury of peripheral nerves]. [In Russian].
8. Ninel' V.G., Norkin I.A., Puchin'jan D.M. et al. Gistomorfologicheskaja ocenka jeffektivnosti vozdeystvija peremennogo magnitnogo polja i impul'snogo toka na regeneraciju sedalishhnogo nerva krysa v jeksperimente // Fundament. issled. 2012. No 12 (2). p. 336–340. [Histomorphological evaluation of the efficiency of alternating magnetic fields and pulse current on the regeneration of the sciatic nerve in rats in the experiment]. [In Russian].
9. Stepanov G. A., Krupatkin A. I., Morgunov A. Ju. Ocenka mikrocirkuljacii spinного mozga pri ego ostroj jeksperimental'noj travme s pomoshh'ju lazernoj dopplerovskoj floumetrii // Vestnik travmatol. i ortopedii im. N. N. Priorova. 2005.No 2. P. 29–32. [Peculiarities of Microcirculation in Acute Experimental Spinal Cord Injury]. [In Russian].
10. Timofeeva L.B., Blagova N.V., Velichanskaja A.G. et al. Dinamika kolichestva chuvstvitel'nykh i motornykh neuronov, uchastvujushchih v regeneracii sedalishhnogo nerva krysa posle ego pererezki // Morfol. vedomosti. 2011. No 1. P. 52–57. [Quantitative analysis of sensory and motor neurons related to the rat sciatic nerve regeneration after its cutting]. [In Russian].
11. Tihodeev S.A., Ivanova T.N. Novyj sposob registracii spinal'nogo krovoobrashhenija pri zabolevanijah i travmah pozvonochnika // Vestnik hirurgii. 1995. No 154 (4–6). p. 83–85. [New way of registration of spinal blood circulation at diseases and spine injuries].
12. Shhurova E. N., Hudjaev A. T. Issledovanie mikrocirkuljacii spinного mozga s pomoshh'ju lazernoj dopplerovskoj fluometrii u bol'nykh s ostroj pozvonochno-spinnomozgovoj travmoj // Metodologija fluometrii. 2001. No 5. p.77–86. [Investigation of spinal cord microcirculation with the help of Laser Doppler flowmetry research at patients with spinal cord injury]. [In Russian].
13. Ambron R.T., Walters E.T. Priming events and retrograde injury signals. A new perspective on the cellular and molecular biology of nerve regeneration // Mol. Neurobiol. 1996. No 13. P. 61–79.
14. Beggs S., Liu X. J., Kwan C. et al. Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier // Mol. Pain. 2010. No 2 (6). P. 74.
15. Benton R. L., Maddie M. A., Worth C. A. et al. Transcriptomic screening of microvascular endothelial cells implicates novel molecular regulators of vascular dysfunction after spinal cord injury // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 2008. No 28 (11). P. 1771–1785.
16. Buchweitz E., Weiss H. Alterations in perfused capillary morphology in awake vs anesthetized brain // Brain. Res. 1986. No 377. P. 105–111.
17. Carlson A. P., Yonas H. Radiographic assessment of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: the physiological perspective // Neurol. Res. 2009. No 31. P. 593–604.
18. Daneyemez M. Silicone rubber microangiography of injured acute spinal cord after treatment with methylprednisolone and vitamin E in rats // Spine (Phila Pa 1976). 1999. No 24 (21). P. 2201–2205.
19. Davalos D., Lee J. K., Smith W. B. et al. Stable in vivo imaging of densely populated glia, axons and blood vessels in the mouse spinal cord using two-photon microscopy // J. Neurosci. Methods. 2008. No 169 (1). P. 1–7.
20. Fairholm D. J., Turnbull I. M. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries // J. Neurosurg. 1971. No 35 (3). P. 277–286.
21. Fisher M. A. AAEM Minimonograph #13: H reflexes and F waves: physiology and indications // Muscle and Nerve. 1992. No 15. P. 1223–1233.
22. Frerichs K. U., Feuerstein G. Z. Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow // Mol. Chem. Neuropathol. 1990. No 12 (1). P. 55–70.
23. Gordh T., Sharma H. S. Chronic spinal nerve ligation induces microvascular permeability disturbances, astrocytic reaction, and structural changes in the rat spinal cord // Acta. Neurochir. Suppl. 2006. No 96. P. 335–340.

24. Guerit J. M., Verhelst R., Rubayet al J. Multilevel somatosensory evoked potentials (SEPs) for spinal cord monitoring in descending thoracic and thoraco-abdominal aortic surgery // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 1996. No 10. P. 93–103.
25. Hart M. A., Brannstrom T., Wiberg M. et al. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination // *Exp. Brain. Res.* 2002. No 142 (3). P. 308–318.
26. Holtz A., Nystrom B., Gerdin B. Regulation of spinal cord blood flow in the rat as measured by quantitative autoradiography // *Acta. Physiol. Scand.* 1988. No 133. P. 485–493.
27. Hu J. Z., Wu T. D., Zeng L. et al. Visualization of microvasculature by x-ray in-line phase contrast imaging in rat spinal cord // *Phys. Med. Biol.* 2012. No 57 (5). P. 55–63.
28. Hukuda S., Amano K. Spinal cord tissue oxygen in experimental ischemia, compression, and central necrosis // *Spine. Iphila. Pa.* 1976. No 5 (4). P. 303–306.
29. Kato A., Ushio Y., Hayakawa T. et al. Circulatory disturbance of the spinal cord with epidural neoplasm in rats // *J. Neurosurg.* 1985. No 63 (2). P. 260–265.
30. Koyanagi I., Tator C. H., Lea P. J. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 1: Normal spinal cord // *Neurosurgery.* 1993. No 33 (2). P. 277–283.
31. Koyanagi T., Kawaharada N., Kurimoto Y. Examination of Intercoastal Arteries with Transthoracic Doppler Sonography // *Echocardiography.* 2009. No 1. P. 17–20.
32. LeMaire S. A., Undar A., Junkerman J. et al. Use near-infrared spectrophotometry to monitor spinal cord oxygenation during intercostal artery ligation: preliminary experimental results // *Ann. Thorac. Surg.* 2002. No 73. P. 375.
33. Li Y., Song Y., Zhao L. et al. Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye DiI // *Nat. Protoc.* 2008. No 3 (11). P. 1703–1708.
34. Lindsberg P. J., Jacobs T. P., Frerichs K. U. et al. Laser-Doppler flowmetry in monitoring regulation of rapid microcirculatory changes in spinal cord // *Am. J. Physiol.* 1992. No 263. P. 89–92.
35. Lips J., de Haan P., Bouma G. J. et al. Continuous monitoring of cerebrospinal fluid oxygen tension in relation to motor evoked potentials during spinal cord ischemia in pigs // *Anesthesiology.* 2005. No 102 (2). P. 340–345.
36. Ma J., Novikov L. N., Wiberg M. et al. Delayed loss of spinal motoneurons after peripheral nerve injury in adult rats: A quantitative morphological study // *Exp. Brain. Res.* 2001. No 139. P. 216–223.
37. Madiati F., Hussain S. R., Goettl V. M. et al. Upregulation of FGF-2 in reactive spinal cord astrocytes following unilateral lumbar spinal nerve ligation // *Exp. Brain. Res.* 2003. No 148 (3). P. 366–376.
38. Mayevsky A., Frank K., Muck M. et al. Multiparametric evaluation of brain functions in the Mongolian gerbil in vivo // *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 1992. No 3. P. 323–342.
39. Moy A. J., Wiersma M. P., Choi B. Optical histology: a method to visualize microvasculature in thick tissue sections of mouse brain. *PLoS // One.* 2013. No 8 (1). P. 537–553.
40. Nanai B., Lyman R., Bichsel P. S. Use of intraoperative ultrasonography in canine spinal cord lesions // *Vet. Radiol. Ultrasound.* 2007. No 48 (3). P. 254–261.
41. Novikova L., Novikov L., Kellerth J-O. Brain derived neurotrophic factor reduces necrotic zone and supports neuronal survival after spinal cord hemisection in adult rats // *Neurosci. Lett.* 1996. No 220. P. 203–206.
42. Ohkuma H., Itoh K., Shibata S. et al. Morphological changes of intraparenchymal arterioles after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs // *Neurosurgery.* 1997. No 41. P. 230–236.
43. Palleske H., Herrmann H. D. Experimental investigation on the regulation of the blood flow of the spinal cord. I. Comparative study of the cerebral and spinal cord blood flow with heat clearance probes in pigs // *Acta. Neurochir. (Wein).* 1968. No 19. P. 73–80.
44. Ranson S. W. Alterations in the spinal ganglion cells following neurotomy // *J. Comp. Neurol. Psychol.* 1909. No 19. P. 125–153.
45. Santillan A., Nacarino V., Greenberg E. et al. Vascular anatomy of the spinal cord // *J. Neurointerv. Surg.* 2012. No 4 (1). P. 67–74.
46. Sharma H. S. Early microvascular reactions and blood-spinal cord barrier disruption are instrumental in pathophysiology of spinal cord injury and repair: novel therapeutic strategies including nanowired drug delivery to enhance neuroprotection // *J. Neural. Transm.* 2011. No 118 (1). P. 155–176.
47. Shieff C., Vieira J. F., Nashold B. S. Jr. et al. Electrical impedance recording for localization in functional neurosurgery of the spinal cord and lower brain stem // *Acta. Neurochir. Suppl. (Wien).* 1987. No 39. P. 174–176.
48. Simonovich M., Barbiro-Michaely E., Mayevsky A. Real-time monitoring of mitochondrial NADH and microcirculatory blood flow in the spinal cord // *Spine (Phila Pa 1976).* 2008. No 33 (23). P. 2495–2502.
49. Suzuki Y. Changes of microcirculation dynamics in the formation of edema following spinal compression injury in rabbits // *Nihon. Seikeigeka. Gakkai. Zasshi.* 1985. No 59 (7). P. 707–718.
50. Tandrup T., Woolf C. J., Coggeshall R. E. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve // *J. Comp. Neurol.* 2000. No 422 (2). P. 172–180.
51. Tang J., Hua Y., Su J. et al. Expression of VEGF and neural repair after alprostadil treatment in a rat model of sciatic nerve crush injury // *Neurol. India.* 2009. No 57. P. 387–394.
52. Tschetter T. H., Klassen A. C., Resch J. A. et al. Blood flow in the central and peripheral nervous system of dogs using a particle distribution method // *Stroke.* 1970. No 1 (5). P. 370–374.
53. Tsvetovskiy S. B., Stupak V. V. Monitoring of Spinal Cord Functional Status in Patients with Intramedullary Tumors // *Spine Surgery: Digest.* 2013. No 1. P. 1–10.
54. Vogel J., Hermes A., Kuschinsky W. Evolution of microcirculatory disturbances after permanent middle cerebral artery occlusion in rats // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 1999. No 19. P. 1322–1328.
55. Weiss H. R. Measurement of cerebral capillary perfusion with a fluorescent label // *Microvasc. Res.* 1988. No 36. P. 172–180.
56. Wullenweber R. «Itracerebral steal» in man recorded by a heat clearance technique // *Scand. J. Clin. Lav. Invest. Suppl.* 1968. No 102.